

среднем в 1,2 раза ниже по сравнению с наиболее оптимальным вариантом.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что оптимальными условиями экстрагирования для достижения наиболее высокой АРА экстрактов из каллусной и суспензионной культур эхинацеи пурпурной является проведение кипячения при 100°C в течение 15 мин. При этом показатели АРА 0,01%-ных водно-спиртовых экстрактов не уступают по величине активности таких известных антиоксидантов как аскорбиновая кислота и кверцетин в концентрации 50 мкМ. Установленные закономерности могут быть использованы для оптимизации технологий получения экстрактов из биомассы культур клеток и тканей эхинацеи пурпурной.

Библиографические ссылки

1. Меньщикова, Е.Б. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Структура, свойства, механизмы действия / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.В. Кандалинцева. – Lambert Academic Publishing, 2012. – 495 с.
2. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations / J.L. Parsons [et al.] // Pharm Biol. – 2018. – Vol. 56, №1. – P. 485–494.
3. Анализ производных кофейной кислоты в каллусной культуре *Echinacea purpurea* / Т.И. Дитченко, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, О.В. Молчан, В.М. Юрин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Том 7. № 2. – С. 54-63.
4. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – Vol. 102, № 20. – P. 8661–8675.
5. Villarreal M.O. Plant cell culture strategies for the production of natural products / M.O. Villarreal [et al.] // BMB Reports. – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 149–158.
6. Филиппенко, Т.А. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом / Т.А. Филиппенко, Н.И. Белая, А.Н. Николаевский // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – № 8. – С. 34-36.

Влияние нанокompозитов хитозан-серебро на компоненты антиоксидантной системы микрорклональных растений картофеля в культуре *in vitro*

**Еловская Н. А.^{А*}, Калацкая Ж. Н.^А, Рыбинская Е. И.^А,
Гилевская К. С.^Б, Куликовская В. И.^Б**

^А Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, лаборатория роста и развития растений, Минск, Беларусь. *E-mail: yalousskaya92@mail.ru

^Б Институт химии новых материалов НАН Беларуси, лаборатория микро- и наноструктурированных систем, Минск, Беларусь

Серебро, благодаря антибактериальным и фунгицидным свойствам, активно используется для синтеза наночастиц (НЧ), широко применяемых

в сельском хозяйстве. В процессе экологически чистого синтеза металлических НЧ дорогостоящие и потенциально опасные восстанавливающие и стабилизирующие агенты заменяются на природные полимеры. Одним из таких биополимеров является хитин и его производное – хитозан. В процессе синтеза amino- и гидроксильные группы хитозана образуют связи с поверхностью НЧ [1]. Получаемые таким образом стабилизированные НЧ серебра (НЧ Ag) способны проявлять свойства, присущие каждому из компонентов, а также синергетически усиливать их [2].

Несмотря на активное изучение взаимодействия НЧ Ag с растениями, подавляющая часть исследований учитывает лишь влияние размера НЧ на растительные клетки, но не принимает во внимание структуру НЧ и участие стабилизирующей оболочки в системе «растительная клетка – НЧ».

В связи с этим возникла необходимость изучить влияние нанокомпози́тов на основе НЧ Ag разных структурных типов, стабилизированных хитозаном, на растения. Для первичного скрининга использование культуры *in vitro* наиболее оправданно, т. к. позволяет в короткие сроки оценить характер взаимодействия соединений с растительным объектом.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния различных концентраций и структурных типов стабилизированных хитозаном НЧ серебра на редокс состояние растений картофеля в культуре *in vitro*.

Оздоровленные растения-регенеранты картофеля клонировали в стерильных условиях ламинар-бокса на стандартную агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС-среда) (агар – 5 г/л, сахароза – 30 г/л, аскорбиновая кислота – 3,0 мг/л, индолил-3-уксусная кислота – 1,0 мг/л, pH 5,7) и выращивали в течение 4-х недель, после чего проводили замену МС-среды на жидкие модифицированные, содержащие нанокомпози́ты хитозан-Ag (НК Хит-Ag4 и НК Хит-Ag5) двух структурных типов в различных концентрациях (табл. 1). Структура НК Хит-Ag4 представляет собой монодисперсные наночастицы серебра, собранные в сферические агрегаты, погруженные в хитозан, тогда как строение НК Хит-Ag5 соответствует структуре «ядро (наночастица Ag⁰) – оболочка (хитозан)» [3] Микроклоны выращивали на модифицированных МС-средах в течение 6 недель, после чего проводили оценку редокс-состояния растений на основании накопления в стеблях пероксида водорода и фенольных соединений, изменений антиоксидантной и антирадикальной активностей, а также – активности антиоксидантных ферментов – пероксидазы (ПО) и супероксиддисмутазы (СОД).

Таблица 1

Влияние нанокompозитов хитозан-серебро на отдельные биохимические показатели в стеблях микроклональных растений картофеля в культуре *in vitro*

Вариант	C _{хит} , мг/мл	C _{Ag} , мкг/ мл	Показатель			
			H ₂ O ₂ , мкмоль/г сырой массы	Фенольные соедине- ния, мг/г сухой массы	Общая АО ак- тивность, мМ/г сухой массы	Антирадикальная активность, %
Конт- роль	—	—	23,56±0,77 ^a	26,81±2,89 ^a	165,13±15,30 ^a	37,32±2,17 ^a
Хит-Ag4						
B1	0,1	1	27,18±0,94 ^b	34,96±1,36 ^b	141,58±8,76 ^a	56,77±1,86 ^b
B4	0,05	0,5	14,70±5,88 ^c	23,28±0,71 ^a	105,90±1,71 ^b	42,72±0,16 ^c
B7	0,01	0,1	8,40±3,99 ^c	25,18±0,53 ^a	125,65±6,00 ^b	40,46±1,87 ^a
Хит-Ag5						
B3	0,1	10	32,77±3,56 ^b	27,50±0,62 ^a	121,55±4,22 ^{bc}	56,52±2,08 ^b
B6	0,05	5	23,60±0,98 ^a	29,05±0,48 ^a	133,26±0,57 ^b	48,55±0,55 ^c
B2	0,01	1	25,59±0,90 ^a	24,92±1,66 ^a	106,49±12,86 ^c	40,11±2,96 ^a
B5	0,005	0,5	13,51±1,86 ^c	24,56±1,19 ^a	127,18±5,23 ^{bc}	39,07±0,82 ^a
B8	0,001	0,1	23,70±1,17 ^a	26,31±0,98 ^a	132,24±7,36 ^b	46,08±2,10 ^c

Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm Sd$ (где M – это среднее арифметическое значение, Sd – стандартное отклонение) трех биологических повторностей. Варианты (B1, B4, B7) нанокompозита Хит-Ag4 и варианты (B3, B6, B2, B5, B8) нанокompозита Хит-Ag5 сравнивались с контролем, сравнение опытных вариантов двух нанокompозитов друг с другом не проводилось. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) характеризуют достоверные различия при $p \leq 0,05$.

Содержание пероксида водорода можно рассматривать в качестве первичного маркера стрессовой реакции растительного организма на воздействие любой природы. В вариантах B1 НК Хит-Ag4 и B3 НК Хит-Ag5, содержащих в составе стабилизирующей оболочки хитозан в концентрации 0,1 мг/мл, выявлено увеличение содержания пероксида водорода в стеблях микроклонов картофеля на 15,4 и 39,1% по сравнению с контролем соответственно (табл. 1). При этом значительное образование H₂O₂ в варианте B3 может быть связано с увеличением концентрации серебра до 10 мкг/мл по сравнению с вариантом B1 (табл. 1). В то же время, в варианте B2 НК Хит-A5, содержащего 1 мкг/мл Ag и в 10 раз больше хитозана по сравнению с вариантом B1 НК Хит-Ag4, содержание H₂O₂ сохранялось на уровне контрольных значений (табл. 1). В варианте B4 НК Хит-Ag4 выявлено снижение исследуемого показателя на 37,6% по сравнению с контрольными растениями, в то время как в варианте B6 НК Хит-A5, содержащего такую же концентрацию хитозана и в 10 раз больше серебра (5 мкг/мл против 0,5 мкг/мл в B4 НК Хит-Ag4) уровень H₂O₂ не изменялся по сравнению с контролем (табл. 1). При анализе влияния вариантов

В4 НК Хит-Ag4 и В5 НК Хит-Ag5, характеризующихся равными концентрациями Ag и различающихся содержанием хитозана в 10 раз, выявлено снижение образования H_2O_2 на 37,6 и 42,7% по отношению к контролю соответственно (табл. 1). В варианте В7 НК Хит-Ag4 содержание H_2O_2 снизилось на 64,3%, тогда как в варианте В8 НК Хит-Ag5 с более тонкой хитозановой оболочкой исследуемый показатель оставался на уровне контрольных значений (табл. 1).

Активность ПО возросла во всех вариантах НК Хит-Ag4 по сравнению с контролем (рис. 1а). Добавленный в МС-среду НК Хит-Ag5 в различных концентрациях оказал неоднозначное действие на пероксидазную активность (рис. 1б). Так, наиболее значительное усиление активности в работе фермента в 3,9 раза по сравнению с контролем было выявлено при использовании наименьшей концентрации хитозана – в варианте В8 (рис. 1б). В вариантах В3 и В6 активность ПО изменялась аналогичным образом – увеличение на 143,8 и 131,8% по сравнению с контролем (рис. 1б). Тогда как в вариантах В2 и В5 интенсивность ПО сохранялась на уровне контрольных значений (рис. 1б).

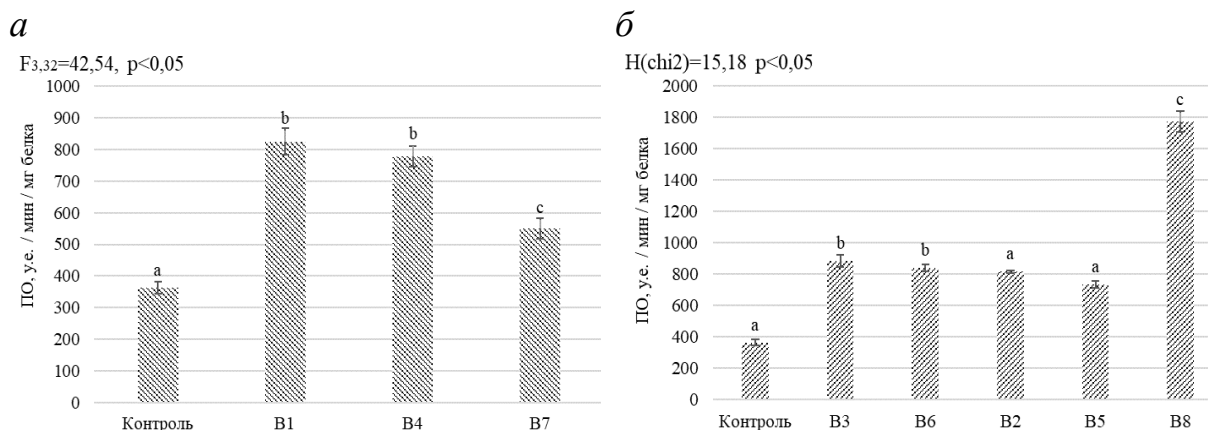


Рис. 1. Влияние НК Хит-Ag4 (а) и НК Хит-Ag5 (б) на активность пероксидазы (ПО) в стеблях микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm Se$ (где M – это среднее арифметическое значение, Se – стандартная ошибка) трех биологических повторностей. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) характеризуют достоверные различия при $p \leq 0,05$.

Варианты В1 и В3 НК Хит-Ag4 и Хит-Ag5, содержащие хитозан в концентрации 0,1 мг/мл и серебро – 1 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно, не повлияли на активность СОД (рис. 2а и 2б). В то же время, в варианте В2 выявлено увеличение активности фермента на 56,8% по сравнению с контролем (рис. 2б). В варианте В4 активность СОД снизилась на 12,8%, тогда как в варианте В6, с концентрацией серебра в 10 раз выше, и в варианте В5, с концентрацией хитозана в 10 раз меньше, исследуемый показате-

тель оставался на уровне контрольных значений (рис. 2а и 2б). В вариантах В7 НК Хит-Ag4 активность СОД снизилась на 75,4%, в то время как в варианте В8, содержащего в 10 раз меньше хитозана, активность СОД увеличилась на 58,1% по сравнению с контролем (рис. 2а и 2б).

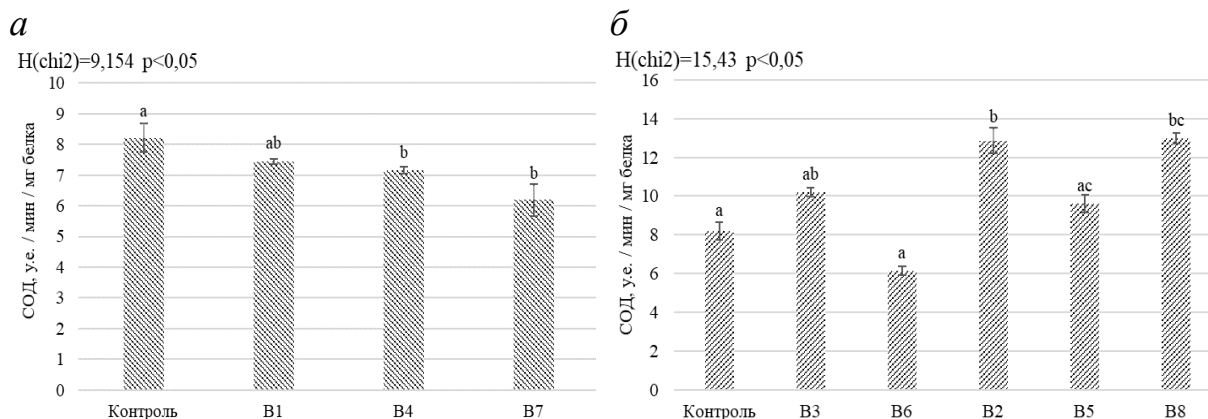


Рис. 2. Влияние НК Хит-Ag4 (а) и НК Хит-Ag5 (б) на активность супероксиддисмутазы (СОД) в стеблях микроклонов картофеля в культуре *in vitro*
Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm Se$ (где M – это среднее арифметическое значение, Se – стандартная ошибка) трех биологических повторностей. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) характеризуют достоверные различия при $p \leq 0,05$.

Изменения в содержании фенольных соединений в стеблях микроклонов картофеля были выявлены в варианте В1 Хит-Ag4 – увеличение на 30,4% по сравнению с контролем (табл. 1). Общая антиоксидантная (АО) активность экстрактов микроклональных растений картофеля снизилась практически во всех вариантах по сравнению с контролем (табл. 1). Так, в вариантах В4 и В7 НК Хит-Ag4 исследуемый показатель снизился на 35,9 и 23,9% по сравнению с контролем соответственно (табл. 1). Все варианты НК Хит-Ag5 продемонстрировали снижение АО активности по сравнению с контролем (на 26,4% для варианта В3, на 19,3% для варианта В6, на 35,5% для варианта В2, на 23,0% для варианта В5 и на 19,9% для варианта В8) (табл. 1).

Антирадикальная активность экстрактов, выделенных из стеблей растений картофеля, усиливалась в вариантах В1 и В3 на 52,1 и 51,4% и в вариантах В4 и В6 на 14,5 и 30,1% по сравнению с контролем (табл. 1). При анализе влияния НК с одинаковым содержанием Ag, но различающихся по содержанию хитозана в составе стабилизирующей оболочки, были выявлены схожие изменения антирадикальной активности в вариантах В1 и В2, В4 и В5: при увеличении доли хитозана в составе НК усиливалась и антирадикальная активность (на 52,1% для варианта В1 и на 14,5% для варианта В4) по сравнению с контролем (табл. 1). В свою очередь, в вариантах В7 и В8 обнаружили обратный эффект: при уменьшении

содержания хитозана в 10 раз (с 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл) антирадикальная активность увеличилась на 23,5% (в варианте В8) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таким образом, концентрации хитозана в серебросодержащем нанокompозите оказывают влияние на изменение компонентов антиоксидантной системы микрорастений картофеля. Варианты В1 и В3 значительно повышали содержание перекиси водорода и модифицировали антиоксидантный статус в растительной ткани, что, вероятно, указывает на их стрессовое воздействие. Структура нанокompозита Хит-Аg5, представляющая собой «ядро (наночастица Ag^0) – оболочка (хитозан)», и концентрация, используемая в варианте В8, оказывает наиболее значительное изменение активности антиоксидантных ферментов микроклонов картофеля. В то время как в вариантах нанокompозита Хит-Аg4, где наночастицы серебра собраны в сферические погруженные в хитозан агрегаты, прослеживается тенденция снижению антиоксидантной активности с уменьшением концентраций серебра и хитозана.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б24М-006).

Библиографические ссылки

1. Chitosan-capped silver nanoparticles: A comprehensive study of polymer molecular weight effect on the reaction kinetic, physicochemical properties, and synergetic antibacterial potential / V. Kulikouskaya, K. Hileuskaya, A. Kraskouski, I. Kozerozhets, E. Stepanova, I. Kuzminski, L. You, V. Agabekov // SPE Polym, 2022. – Vol. 3(2). – P. 77. Doi: 10.1002/pls2.10069.

2. Gowda, S. Green synthesis of chitosan silver nanocomposites and their antifungal activity against *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose in chillies / S. Gowda, S. Sri-ram // Plant Nano Biology, 2023. – Vol. 5. – P. 10041. Doi: 10.1016/j.plana.2023.100041.

3. Vasilkevich, V. M. Silver nanoparticles stabilized with a chitosan shell: physical-chemical properties and features of the toxic effect *in vivo* / V. M. Vasilkevich, R. V. Bogdanov, K. S. Hileuskaya, V. I. Kulikouskaya, E. A. Stepanova, I. I. Kuzminski // Nanobiotechnology Reports, 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 133–141. Doi: 10.1134/S2635167623010172.