

УДК 57.063:582.9:630*813.2:581.19

Антирадикальная активность экстрактов из лишайников

О.М. ХРАМЧЕНКОВА

Изучали антирадикальную активность ацетонового, бензольного, метанольного, этанольного и этилацетатного экстрактов из лишайников *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Применяли ДФПГ-тест и метод обесцвечивания β -каротина. Для позитивного контроля использовали α -токоферол. Показано, что экстракты из *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria* обладают выраженной активностью в отношении ДФПГ, тогда как методом обесцвечивания β -каротина антирадикальная активность подтверждается для экстрактов из *E. prunastri* и *R. pollinaria*.

Ключевые слова: экстракты из лишайников, антирадикальная активность, 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ), линолевая кислота, обесцвечивание β -каротина, α -токоферол, процент ингибирования, спектрофотометрия.

The antiradical activity of acetone, benzene, methanol, ethanol, and ethyl acetate extracts from the lichens *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, and *Xanthoria parietina* was studied. The 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) and the β -carotene bleaching assay were used; α -tocopherol was used as a positive control. It was shown that extracts from *E. prunastri*, *H. physodes* and *R. pollinaria* had a pronounced activity against DPPH, while antiradical activity was confirmed by the β -carotene bleaching assay for the extracts from *E. prunastri* and *R. pollinaria*.

Keywords: lichen extracts, antiradical activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), linoleic acid, β -carotene bleaching, α -tocopherol, percent inhibition, spectrophotometry.

Введение. Различного рода окислительные процессы постоянно протекают в живых системах. Многие из них связаны с образованием свободных радикалов – высоко реакционноспособных частиц с одним или несколькими неспаренными электронами на внешней электронной оболочке. Свободные радикалы вступают в характерные химические реакции с веществами живых систем, вызывая нарушения метаболизма, в том числе – дегенеративные, что приводит к появлению различных патологий. Ингибирование и/или нейтрализацию окислительного действия свободных радикалов осуществляют антиоксиданты, как являющиеся естественными продуктами жизнедеятельности, так и привнесенные извне.

В настоящее время весьма актуальным является скрининг антиоксидантных свойств веществ природного происхождения, а также комплексов таких веществ, чаще всего являющихся экстрактами из различных природных объектов. Одним из таких объектов являются экстракты из лишайников, рассматриваемых в настоящее время в качестве симбиотических ассоциаций микобионта (гриба) и фотобионта, называемого также фикобионом, так как он представлен микроскопическими зелеными водорослями и/или цианобактериями. Лишайников известно более 25000 видов, каждый из них содержит в гифах микобионта уникальные лишайниковые вещества, обладающие высокой и разнообразной биологической активностью [1]–[3].

В работе [4] нами обобщены научные данные об антиоксидантной активности экстрактов из лишайников. Показано, что имеющиеся результаты оценки антиоксидантных свойств экстрактов из лишайников разрозненны, противоречивы и зачастую не могут быть сопоставлены между собой. Основные причины существующего положения дел сводятся к следующему: на предмет антиоксидантных свойств проанализировано менее одной сотой части видов лишайников, а если учесть, что для получения экстрактов используется около десяти различных экстрагентов, то указанная доля исследованности уменьшается еще на порядок. Применяемые методы оценки антиоксидантной активности экстрактов из лишайников неспецифичны, базируются на реакциях, отсутствующих в живых системах, требуют использования концентраций, не характерных для живых клеток, не исключают влияния иных меха-

низмов на реализацию и величину регистрируемого показателя. Наконец, зачастую антиоксидантная активность анализируемых экстрактов из лишайников оказывается ниже таковой для известных «классических» антиоксидантов. Особую трудность при сравнении данных составляет частое отсутствие внятного протокола анализа и представления результатов исследования в неких общих единицах измерения.

Антирадикальные свойства экстрактов из лишайников характеризуют их способность реагировать со свободными радикалами, внесенными или генерированными в исследуемой системе. В настоящей работе мы использовали следующие методические подходы: к исследованию приняли ацетоновые, бензольные, метанольные, этанольные и этилацетатные экстракты из пяти видов лишайников, широко распространенных в Беларуси и образующих значимые скопления биомассы в местах произрастания; 2) для оценки антирадикальной активности использовали ДФПГ-тест и метод обесцвечивания β -каротина, для которых прописан протокол анализа в сравнительно свежих научных публикациях [5]–[7]; для положительного контроля в обоих случаях использовали α -токоферол, что позволяет сравнивать результаты анализов между собой и с полученными ранее другими исследователями [4].

ДФПГ-тест является методом определения именно антирадикальной активности изучаемой субстанции, так как в ходе анализа ею восстанавливается стабильный свободный радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ) – рисунок 1 [4].

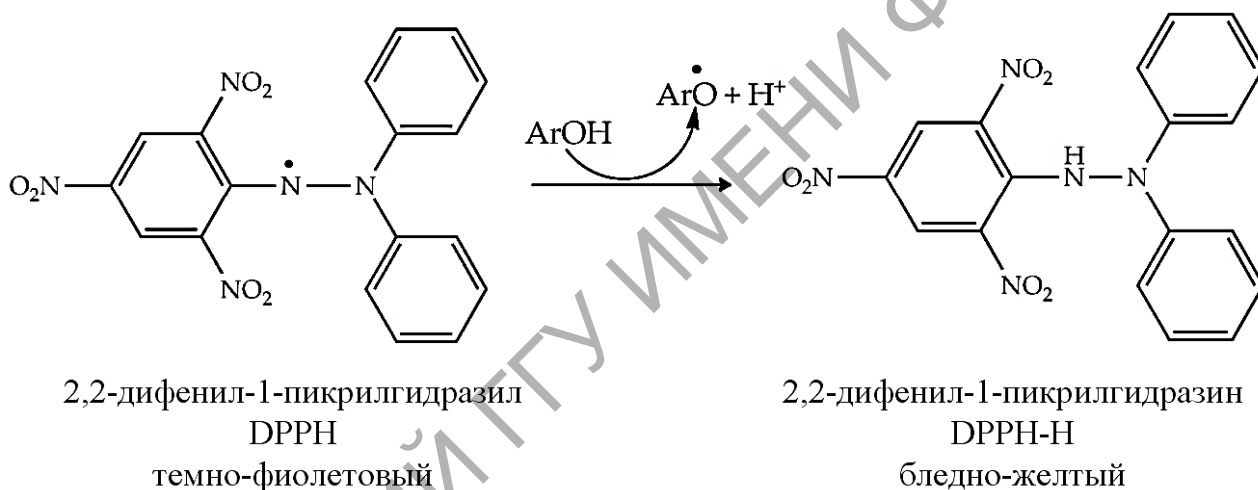


Рисунок 1 – Схема восстановления 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила

Раствор ДФПГ темно-фиолетового цвета с максимумом поглощения при 517 нм, под действием исследуемых веществ постепенно обесцвечивается до бледно-желтого цвета, а его оптическая плотность при 517 нм является мерой антирадикальной активности изучаемого экстракта.

Другим способом оценки антирадикальных свойств природных веществ является так называемый метод обесцвечивания β -каротина. В процессе приготовления реакционной смеси за счет неферментативного окисления линолевой кислоты генерируется пероксильный радикал, который реагирует с β -каротином, образуя стабильный β -каротиновый радикал. В результате оранжево-желтый раствор обесцвечивается. Компоненты экстрактов из лишайников конкурируют с пероксильным радикалом – рисунок 2 [4]. Путем регистрации оптической плотности раствора при 470 нм (типичная длина волны поглощения β -каротина) отслеживается окисление каротин-линолевой эмульсии.

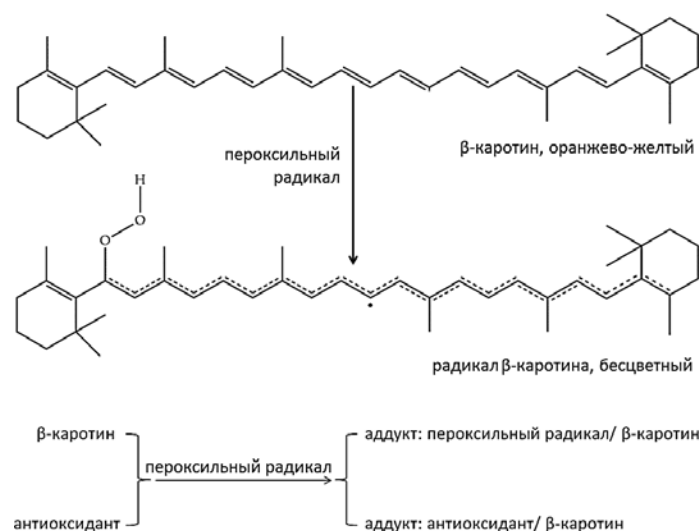


Рисунок 2 – Обесцвечивание β-каротина при окислении линолевой кислоты

Настоящее исследование посвящено скринингу антирадикальных свойств экстрактов из пяти видов лишайников, распространенных в Беларуси.

Методы исследований. Образцы лишайников *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. высушивали до воздушно-сухого состояния, измельчали. Навески биомассы экстрагировали в аппарате Сокслета ацетоном, бензолом, метанолом, этилацетатом и этанолом. Растворители удаляли, экстракты высушивали, растворяли в метаноле в концентрации 1 мг/мл.

ДФПГ-тест. Использовали методические подходы, изложенные в [8]–[10]. ДФПГ разводили метанолом до концентрации 1 мМ/л; α-токоферол использовали в концентрации 1 омг/мл. Равные объемы (2 мл) растворов ДФПГ и экстрактов из лишайников или раствора α-токоферола смешивали, инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре, после чего измеряли оптическую плотность растворов при 517 нм.

Процент ингибирования ДФПГ вычисляли по формуле:

$$I\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \cdot 100;$$

где, A_c – оптическая плотность «холостой» пробы; A_s – оптическая плотность образца.

Обесцвечивание β-каротина. Использовали методические подходы, изложенные в [11]–[14]. В 50 мл хлороформа растворяли 10 мг β-каротина. Готовили реакционную смесь: к 1 мл раствора β-каротина приливали 20 мкл линолевой кислоты, добавляли 0,2 мг эмульгатора ТВИН-20, 0,2 мл раствора экстракта из лишайников (или α-токоферола) и 50 мл дистиллированной воды, предварительно насыщенной кислородом. Смесь энергично встряхивали на протяжении 15 минут, после чего измеряли оптическую плотность при 470 нм. Затем образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре на протяжении 48 ч, после чего снова определяли их оптическую плотность при 470 нм.

Антирадикальную активность вычисляли по формуле:

$$АРА\% = 100 \cdot \left[1 - \frac{A_{06}^0 - A_{06}^{48}}{A_K^0 - A_K^{48}} \right],$$

где A_{06}^0 , A_{06}^{48} – оптическая плотность реакционной смеси с образцом (раствор экстракта из лишайника в метаноле) через 0 ч и 48 ч инкубации, соответственно; A_K^0 , A_K^{48} – оптическая плотность реакционной смеси с контролем (метанолом без экстракта из лишайника) через 0 ч и 48 ч инкубации, соответственно.

Все спектрофотометрические измерения производили на УФ-спектрофотометре Solar PB 2201, измерительные кюветы – кварцевые.

Анализ результатов исследования производили с помощью программного продукта Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Часть проанализированных нами экстрактов из лишайников обладает выраженной антирадикальной активностью (ингибируютДФПГ более, чем наполовину) – таблица 1.

Таблица 1 – ИнгибированиеДФПГ экстрактами из лишайников

В процентах

Используемый экстрагент	Вид лишайника				
	<i>C. arbuscula</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>R. pollinaria</i>	<i>X. parietina</i>
Ацетон	42,4 ± 0,84	47,9 ± 0,65	64,6 ± 0,81	52,4 ± 0,49	36,9 ± 0,37
Бензол	52,6 ± 0,57	58,5 ± 0,49	67,4 ± 0,92	54,8 ± 0,49	40,5 ± 0,18
Метанол	72,6 ± 0,75	79,5 ± 0,89	70,3 ± 0,97	75,8 ± 0,91	41,2 ± 0,55
Этанол	57,4 ± 0,69	64,5 ± 0,52	60,1 ± 0,69	71,8 ± 0,79	41,9 ± 0,46
Этилацетат	45,2 ± 0,37	54,8 ± 0,49	62,3 ± 0,55	67,9 ± 0,89	41,5 ± 0,31

Определенный нами процент ингибированияДФПГ α -токоферолом составляет 61,8 ± 0,96. Это согласуется с результатом, приведенным в [15]–[17 Kosanic]. Антирадикальными свойствами обладают ацетоновые и бензольные экстракты из *H. physodes*; все метанольные экстракты, за исключением *X. parietina*; этанольные из *E. prunastri* и *R. pollinaria*; этилацетатные из *H. physodes* и *R. pollinaria*. По результатамДФПГ-теста можно заключить, что экстракты из *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria*, по-видимому, обладают наибольшим антирадикальным потенциалом.

Если сравнивать антирадикальные свойства экстрактов из лишайников с данными, полученными для других «классических» антиоксидантов, взятых вДФПГ-тест, в той же концентрации, что и в настоящем исследовании, то оказывается, что экстракты из лишайников «слабее» аскорбиновой кислоты [18], [19]) или бутилгидрокситолуола [20], [21], для которых процент ингибирования выше 90.

Общепринятым является соображение, что никакое исследование антиоксидантных свойств каких бы то ни было субстанций природного происхождения не является правомочным, если используется один вид теста. Поэтому для выяснения антирадикальной активности изучаемых экстрактов из лишайников мы использовали систему, где свободные радикалы генерируются за счет неферментативного окисления линолевой кислоты кислородом – то есть использовали метод обесцвечивания β -каротина – таблица 2.

Таблица 2 – Обесцвечивание β -каротина экстрактами из лишайников

В процентах

Используемый экстрагент	Вид лишайника				
	<i>C. arbuscula</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>R. pollinaria</i>	<i>X. parietina</i>
Ацетон	39,2 ± 0,49	58,3 ± 0,52	49,4 ± 0,69	67,3 ± 0,27	36,9 ± 0,45
Бензол	28,4 ± 0,78	62,2 ± 0,61	41,5 ± 0,88	71,4 ± 0,53	40,5 ± 0,57
Метанол	29,6 ± 0,34	68,7 ± 0,59	50,7 ± 0,45	69,5 ± 0,39	41,2 ± 0,78
Этанол	24,1 ± 0,51	63,5 ± 0,74	47,2 ± 0,58	65,3 ± 0,83	41,9 ± 0,64
Этилацетат	22,6 ± 0,98	61,8 ± 0,84	45,6 ± 0,75	69,9 ± 0,67	41,5 ± 0,92

Определенный нами процент обесцвечивания β -каротина α -токоферолом составляет 51,2 ± 0,62, что согласуется с работой [14]. Согласно полученным данным, выраженными антирадикальными свойствами обладают все экстракты из *E. prunastri* и *R. pollinaria*. В работе [12] для *R. pollinaria* приводится значение процента ингибирования 26 ± 1, *E. prunastri* – и 46 ± 2; в обоих случаях – для метанольных экстрактов.

ПосколькуДФПГ-тест чаще всего употребляется для оценки антирадикальных свойств экстрактов из лишайников, а метод обесцвечивания β -каротина лишь подтверждает эти результаты, заключим, что нами установлена высокая антирадикальная активность метанольных и этанольных экстрактов из *E. prunastri*, а также метанольных, этанольных и этилацетатных экстрактов из *R. pollinaria*.

Заключение. Оценивали антирадикальные свойства экстрактов из лишайников *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*, полученных методом экстракции по Сокслету с использованием ацетона, бензола, метанола, этанола и этилацетата в качестве экстрагентов. ПрименялиДФПГ-тест и метод

обесцвечивания β -каротина. Показано, что экстракты из *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria* обладают выраженной активностью в отношении ДФПГ, тогда как методом обесцвечивания β -каротина антирадикальная активность подтверждается для экстрактов из *E. prunastri* и *R. pollinaria*.

Литература

1. Gokilavani, R. Biological properties of lichens – A review / R. Gokilavani, H. Rehana // Plant Arch. – 2020. – Vol. 20. – P. 3777–3783.
2. Fernández-Moriano, C. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review / C. Fernández-Moriano, M. P. Gómez-Serranillos, A. Crespo // Pharmaceutical Biology. – 2016. – Vol. 54 (1). – P. 1–17.
3. Ranković, B. Lichen secondary metabolites : bioactive properties and pharmaceutical potential / B. Ranković. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – 202 p.
4. Храменкова, О. М. Антиоксидантные и цитотоксические свойства экстрактов из лишайников / О. М. Храменкова. – Гомель, 2022. – 221 с.
5. 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). – P. 3380–3409.
6. Guidelines for antioxidant assays for food components / F. Xiao [et al.] // Food Frontiers. – 2020. – Vol. 1 (1). – P. 60–69.
7. The versatility of antioxidant assays in food science and safety – Chemistry, applications, strengths, and limitations / N. Bibi Sadeer [et al.] // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9 (8). – P. 709–747.
8. HPLC fingerprint analysis with the antioxidant and cytotoxic activities of selected lichens combined with the chemometric calculations / A. Hawrył [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25 (18). – P. 4301.
9. Usnic acid content and antioxidant activity of three lichen extracts / A. Koptina [et al.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2012. – Т. 10 (2). – С. 68.
10. Antimicrobial and antioxidant activity of *Evernia prunastri* extracts and their isolates / A. Shcherbakova [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 37 (8). – P. 1–14.
11. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea.*, *Dermatocarpon miniatum.*, *Evernia divaricata.*, *Evernia prunastri.*, and *Neofuscella pulla* / A. Aslan [et al.] // Pharmaceutical Biology. – 2006. – Vol. 44 (4). – P. 247–252.
12. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana* / M. Gulluce [et al.] // Phytomedicine. – 2006. – Vol. 13 (7). – P. 515–521.
13. Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold desert of Ladakh / J. Kumar [et al.] // PloS one. – 2014. – Vol. 9 (6). – P. e98696.
14. Comparative evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of selected lichen species from Malaysia / C. Stanly [et al.] // J. Pharm Res. – 2011. – Vol. 4 (8). – P. 2824–2827.
15. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia / M. Kosanic [et al.] // Excli Journal. – 2014. – Vol. 13. – P. 1226–1238.
16. Kosanić, M. Investigation of selected Serbian lichens for antioxidant, antimicrobial and anticancer properties / M. Kosanić, B. Ranković, T. Stanojković // J. Anim Plant Sci. – 2013. – Vol. 23. – P. 1628–1633.
17. Kosanić, M. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species / M. Kosanić, B. Ranković, T. Stanojković // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2012. – Vol. 92 (9). – P. 1909–1916.
18. Study on determination of bioactive potentials of certain lichens // Acta Alimentaria / A. I. Korkmaz [et al.]. – 2018. – Vol. 47 (1). – P. 80–87.
19. Study of antibacterial and antioxidant activities of saxicolous lichen *Xanthoparmelia stenophylla* / A. G. Simonyan [et al.] // Proceedings of the YSU B : Chemical and Biological Sciences. – 2020. – Vol. 54, Iss. 2 (252). – P. 132–137.
20. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Extracts and Lichen Acids Obtained from Some *Umbilicaria* Species from Central Anatolia, Turkey / T. Z. Buçukoglu [et al.] // Journal of food processing and preservation. – 2013. – Vol. 37 (6). – P. 1103–1110.
21. Karaahmet, Z. Antioxidant and Antibacterial Potencies of *Xanthoparmelia conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale and *Dermatocarpon miniatum* (L.) W. Mann. Lichens from Black Sea Region in Turkey / Z. Karaahmet, K. Kinalioğlu, S. Aydın // Gümüşhane Univ. J. Sci. Tech. Inst. – 2019. – Vol. 9. – P. 415–424.