

ЛИШАЙНИКИ РОДА *CLADONIA* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ВИД ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ: ДИАГНОСТИКА И СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Пересыпкина Виктория Станиславовна¹, Проскуряков Алексей Анатольевич², Гребенников Максим Андреевич², Киселева Ольга Анатольевна²

¹МАОУ лицей «Полифорум» №180

²Кафедра фармации

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Лишайники являются уникальными симбиотическими организмами. Они играют огромную роль в функционировании экосистемы. Их мир недостаточно изучен, поскольку они внешне похожи друг на друга или растут в труднодоступных местах. Фенольные соединения в их составе обладают широким спектром лекарственных свойств, включая противомикробные, противовоспалительные, обезболивающие и жаропонижающие. Выбранная тема актуальна, так как с каждым годом медицина движется вперед и требуется новое сырьё для более эффективных лекарственных средств. **Цель исследования** – изучить особенности организации 8 видов лишайников, встречающихся на территории Среднего Урала, и выделить из них биологически- активные вещества фенольной природы. **Материал и методы.** Было проведено тестирование коммерческого набора «Фитоскрин- экспресс» для выделения образцов ДНК, а также была проведена оценка результатов с помощью гель- электрофореза. На примере трех образцов была количественно измерена сумма фенольных соединений. **Результаты.** Проведена пробоподготовка, выделены ДНК и получены ПЦР- продукты при исследовании 4 видов лишайников. Суммарное содержание фенольных соединений в биомассе лишайников исследованных видов рода *Cladonia* составило от 1,03 мг/г до 1,83 мг/г. **Выводы.** Лишайники — это перспективное направление биомедицины, которое требует более детального изучения в будущем. Материал пополнил банк образцов ДНК в лаборатории агрогенетики Фонда «Золотое сечение» и будет использован для дальнейших лишайнологических исследований. Нами показано, что для идентификации лишайников рода *Cladonia* в сырье можно использовать молекулярно- генетические испытания по приведенному в статье протоколу. Используемая методика может помочь доказать наличие лишайника в измельченном или порошкованном лекарственном или парафармацевтическом сборе.

Ключевые слова: лишайники, *Cladonia*, фенольные соединения, лекарственное сырьё, реактив Фолина-Чокальтеу.

LICHENS OF THE GENUS *CLADONIA* AS A PROMISING TYPE OF MEDICINAL RAW MATERIALS: DIAGNOSIS AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS

Peresyapkina Victoria Stanislavovna¹, Proskuryakov Alexey Anatolyevich², Grebennikov Maxim Andreevich², Kiseleva Olga Anatolyevna²

¹Lyceum «Polyforum» № 180

²Department of Pharmacy

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Lichens are unique symbiotic organisms. They play an important role in the functioning of the ecosystem. The Lichens world isn't been studied enough, because they look similar to each other or grow up in hard- to- reach places. Phenolic compounds in their composition have a wide range of medicinal properties, including antimicrobial, anti- inflammatory, analgesic and antipyretic. The chosen line of research is relevant because medicine is moving forward every year and search for a new raw material. **The aim of the study** was lichens investigation of 8 species founded in the territory of the Middle Urals, and to isolate total phenolic substances from them. **Material and methods.** A commercial kit "Phytoscreen- express" tested to isolate DNA samples, and the results were evaluated using gel electrophoresis. Using the example of three samples, we got an insight into the total phenolic compounds from them. **Results.** Sample preparation was carried out, DNA was isolated and PCR products were obtained in the study of 4 species. The total content of phenolic compounds in the lichen biomass of the studied *Cladonia* ranged from 1.03 mg/g to 1.83 mg/g. **Conclusion.** Lichens are promising raw materials for biomedicine that requires more study in the future. The material added to the DNA sample bank in the Laboratory of agrogenetics of the «Zolotoe sechenie» Foundation and will be used for further lichenological research. We have shown that to identify lichens of the genus *Cladonia* in raw materials, molecular genetic tests can be used according to the protocol given in the article. The technique used can help prove the presence of lichen in a crushed or powdered medicinal or parapharmaceutical teas.

Keywords: Lichens, *Cladonia*, phenolic compounds, medicinal raw materials, Folin- Ciocalteu reagent.

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники являются уникальными организмами, состоящими из симбиоза фотобионта и микобионта. Они играют огромную роль в функционировании экосистемы. На территории Среднего Урала произрастают как обычные виды лишайников, так и краснокнижные. Лишайники безусловно имеют значение для медицины, но их мир недостаточно изучен, поскольку они внешне похожи друг на друга или растут в труднодоступных местах. Многие ученые отмечают их специфичные биохимические свойства. Фенольные соединения в составе лишайников обладают широким спектром лекарственных свойств, включая противомикробные, противовоспалительные, обезболивающие и жаропонижающие. Все чаще лишайники попадают в состав парафармацевтических средств, могут быть также использованы как компонента лекарственных препаратов, функциональных продуктов или лечебно – косметического сырья. Для точной идентификации наличия лишайников в измельченном и порошкованном виде не имеет смысла использовать обычные приемы фармакогностического анализа [1].

Цель исследования – для 8 видов лишайников, встречающихся на территории Среднего Урала, предложить метод идентификации сырья на основе молекулярно–генетических методов, количественно оценить содержание биологически– активных веществ фенольной природы у представителей рода *Cladonia*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для своего исследования мы отобрали образцы восьми видов лишайников рода *Cladonia*: *C.coniocraea* (Flörke) Spreng., *C.fimbriata* (L.) Fr., *C.furcata* (Huds.) Schrad, *C.macilenta* Hoffm., *C.polydactyla* (Flörke) Spreng, *C.stellaris* (Opiz) Pouzar & Vêda, *C.rangiferina* (L.) F.H. Wigg. и *C.cenotea* (Ach.) Schaerer, внесенная в Красную книгу Среднего Урала. Определение лишайников проводили согласно указаниям из книги «Определитель лишайников Среднего Урала» [2]. Сбор образцов производился в двух местах: в Загородном образовательном центре «Таватуй» (*C.coniocraea*, *C.fimbriata*, *C.macilenta*, *C.polydactyla* и *C.cenotea*) и в окрестностях города Ивдель (*C.uncialis*, *C.stellaris*, *C.rangiferina*).

Молекулярно – генетические исследования провели на базе Фонда поддержки талантливых детей и молодежи «Золотое сечение». При выделении ДНК мы придерживались инструкций к набору «Фитоскрин Экспресс», предназначенного для выделения ДНК из растений и фитопатогенов, с некоторыми модификациями: измельчили подстилки лишайника с кварцевым песком до однородной смеси, провели ручную гомогенизацию образцов, обработку лизирующим раствором для разрушения клеточной стенки и высвобождения содержимого клетки. Далее следовали сорбция и осаждение нуклеиновых кислот на магнитах. Были сделаны 2– 3 кратное промывание нуклеиновых кислот промывочным раствором, и десорбция нуклеиновых кислот элюирующим раствором [3].

Для подготовки ПЦР опирались на методику, приведенную в статье Primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen– forming ascomycetes (Zoller S., Scheidegger C., Sperisen C., 1999). Состав смеси для проведения ПЦР (полимеразной цепной реакции) несколько модифицирован с учетом доступных на российском рынке компонентов, на 50 µl: реакционная смесь БиоМастер HS– Taq ПЦР– Color 2x (Производитель Биолабмикс) 25 µl, праймер прямой mrSSU1_F 2 µl (Производитель Lumiprobe), праймер обратный mrSSU3R_R 2 µl (Производитель Lumiprobe), образец ДНК 2 µl, бидистиллированная вода 18 µl. Разведение рабочих растворов праймеров провели самостоятельно согласно инструкции производителя. Далее провели амплификацию ДНК на аппарате «Амплификатор детектирующий ДТлайт». Протокол ПЦР: денатурация при 94°C 3 мин; 35 циклов (денатурация при 94°C 1 мин, отжиг 52°C 1 мин, элонгация 72°C 1 мин); финальная элонгация 72°C 7 мин. Длина ожидаемых ДНК должна составлять от 750 до 1000 пар нуклеотидов [4].

После получения ПЦР– продукта и внесения красителя (SYBR GREEN), результаты идентифицировали с помощью гель– электрофореза (в 1% агарозном геле на TBE– буфере), просвечивание в ультрафиолете проводили с помощью трансиллюминатора КвантМ– 312Б, затем фотографировали изображение. Использовали маркер длин ДНК 100+ bp

(Производитель Евrogen). Электрофорез по описанной методике провели трижды на изученных образцах.

Определение наличия фенольных соединений в лишайниках проводили на базе кафедры фармации УГМУ в образцах следующих видов: *C.stellaris*, *C.rangiferina*, *C.furcata*. При этом придерживались общепринятой методики спектрофотометрического анализа с реагентом Фолина– Чокальтеу. Мы размельчили сухую массу лишайников и сделали навески по 1 г. Навески растворили в 10 мл 70% спирта и довели дистиллированной водой до объема 40 мл. Полученные растворы оставили на 3 дня, а затем отфильтровали в два этапа через вату и через фильтровальную бумагу. Далее мы добавили по 10 мл раствора Фолина– Чокальтеу, 8 мл 7,5% карбоната натрия, 2 мл образца. Получившиеся растворы поместили в темное место на 30 минут и дали отстояться. Затем мы измеряли оптическую плотность при 760 нм на спектрофотометре ПЭ– 5400УФ в двух повторностях [5].

Содержание суммы фенольных соединений (мкг/мл) определялось по регрессионному уравнению $y = 0.0089x + 0,6988$ ($R^2 = 0.957$), которое было получено из калибровочного графика, построенного для галловой кислоты. Сумму фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту вычисляли по формуле:

$$C = 0,0089X + 0,6988$$

$$x = \frac{C - 0,6988}{0,0089}$$

$$X = \frac{x \cdot V_1 V_3}{V_2 \cdot m}$$

Где X – сумма фенольных соединений, мкг/г; x – концентрация фенолов, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; V_1 – общий объем экстракта, мл (25 мл); V_2 – объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл (2 мл); V_3 – конечный объем пробы в пробирке, мл (6 мл); m – навеска растительного материала, г (1 г).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами предлагается способ использования молекулярно – генетических методов для идентификации лишайников в сырье на основе отечественных реактивов. Гипотеза состояла в том, что возможно адаптировать общепризнанную в лишайнологии методику для целей фармакогнозии.

В результате проведенной работы, удалось провести успешную ПЦР для 5 видов лишайников. Для *Cladonia macilenta* выделился дополнительный фрагмент нехарактерной длины. Это может быть связано с присутствием в образце ДНК лишайофильного гриба. Такие случаи описаны в литературе [6]. Для *Cladonia fimbriata* и *Cladonia cenotea* выделился только фрагмент ДНК лишайофильного гриба. Для еще одного образца *C.cenotea* выделился целевой фрагмент. Размер целевых продуктов в остальных случаях совпал с ожидаемым, что говорит в пользу верно подобранного состава ПЦР смеси и режима амплификации (рис.1, Таблица 1).

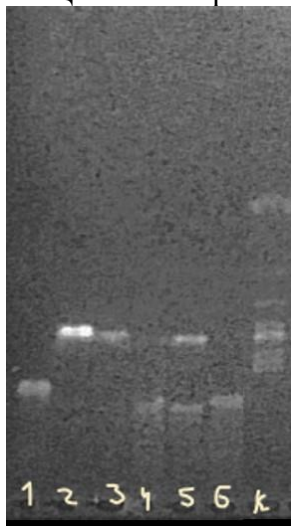


Рис. 1. Результаты гель– электрофореза: 1– *C.coniocraea*, 2– *C.fimbriata*, 3,4 – *C.cenotea*, 5– *C.macilenta*, 6– *C.polydactyla*. К– маркер длин ДНК.

На основе полученных результатов мы можем сказать, что все образцы, исследованные нами, близки, так как бэнды симметричны. Действительно, изученные виды относятся к одному роду – *Cladonia*. Размер полученных целевых фрагментов соответствует литературным данным. Материал пополнил банк образцов ДНК в лаборатории агрогенетики Фонда «Золотое сечение» и будет использован для дальнейших исследований.

Таблица 1.

Получение целевых фрагментов ДНК в результате ПЦР		
Образец	Номер лунки	Примерное количество пар нуклеотидов
<i>Cladonia coniocraea</i>	1	700
<i>Cladonia fimbriata</i>	2	500
<i>Cladonia cenotea</i>	3, 4	520
		800
<i>Cladonia macilenta</i>	5	550, 850
<i>Cladonia polydactyla</i>	6	800
Маркер	К	800

Суммарное среднее содержание фенольных соединений в пересчете на галловую кислоты (мг/мл) представлено в таблице 2. Дальнейшее исследование компонентного состава извлечений сможет прояснить ценность выделенных фенольных соединений с точки зрения медицины.

Таблица 2.

Результаты спектрофотометрического анализа			
Вид лишайника	Значение оптической плотности	Сумма фенольных соединений Мкг/г	Сумма фенольных соединений мг/г
<i>Cladonia stellaris</i>	0,857	1333,146	1,21±0,18
	0,827	1080,337	
<i>Cladonia rangiferina</i>	0,758	498,8764	0,28±0,31
	0,706	60,67416	
<i>Cladonia uncialis</i>	0,912	1796,629	1,73±0,10
	0,895	1653,371	

ОБСУЖДЕНИЕ

Описанная методика проведения ПЦР может помочь доказать наличие лишайника из рода *Cladonia* в измельченном или порошкованном лекарственном или парафармацевтическом сборе. Это предложение выдвинуто нами впервые. Учитывая тот факт, что методика базируется на отечественных реактивах, предложенный алгоритм доступен и его можно легко коммерциализировать в РФ.

Для *C.stellaris* и *C.uncialis*, полученные значения хорошо соотносятся с значениями из научной литературы. Так коллеги с Кафедры фармакогнозии Познаньского университета медицинских наук приводят следующие значения: 6.0–0.1875 мг/г [7].

В научной литературе описаны исследования лишайников, связанные с изучением качественного и количественного состава фенольных соединений. Усиновая кислота относится к классу фенольных соединений и давно привлекает внимание как сильное антисептическое средство [1]. Исследование состава лишайниковых кислот необходимо для расширения спектра природных соединений, которые могут стать субстанциями для получения новых фармацевтических средств.

Ученые из Познаньского медицинского университета рассматривали лишайники *Cladonia uncialis* как ценное сырье биосинтетических соединений против клинических штаммов бактерий и грибов. Биологически – активное вещество фенольной природы затормаживало рост колонии *Staphylococcus epidermidis* и показывало свою антибактериальную активность. Исследования показали низкую антиоксидантную активность, но высокое содержание фенольных кислот около 71,68 грамм [7].

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность получения ДНК лишайников с помощью коммерческого набора “Фитоскрин– экспресс”, предназначенного для анализа растений и фитопатогенов.

2. Получены ПЦР– продукты ожидаемой длины при использовании модифицированной методики на базе отечественных реактивов на примере 4 видов лишайников, растущих на территории Среднего Урала (*C.coniocraea*, *C.polydactyla*, *C.fimbriata* и *C.cenotea*). Описанную в статье методику можно использовать для доказательства присутствия лишайников в сложных сборах.

3. Суммарное содержание фенольных соединений в биомассе лишайников исследованных видов рода *Cladonia* составило от 1,03 мг/г до 1,83 мг/г.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Слонов, Т.Л. Лишайниковые кислоты и фитомасса избранных видов лишайников / Т.Л. Слонов, Л.Х. Слонов // Известия вузов. Северо– Кавказский регион. – 2010. С.79– 82.
2. Пауков, А.Г. Определитель лишайников Среднего Урала / А.Г. Пауков, С.Н. Трапезникова, 2005. – 207с.
3. Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах «Фитоскрин– Экспресс». URL: https://www.syntol.ru/docs/Manuals/PH– 524_Fitoskrin– express_300721.pdf. Текст: электронный (дата обращения 17.03.2024)
4. Zoller, S. PCR Primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen– forming ascomycetes / S. Zoller, C. Scheidegger, C. Sperisen // Lichenologist. – 1999. – Vol. 31, №5. – P. 511– 516.
5. Николаева, Т.Н. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина– Дениса и реактивом Фолина– Чокальтеу: Модификация и сравнение / Т.Н. Николаева, П.В. Лапшин, Н.В. Загоскина // Химия растительного сырья. – 2021. – №2. – С. 291–299.
6. Лишайники и лишенофильные грибы, обнаруженные в северном Приладожье (республика Карелия) в ходе международной полевой экскурсии в августе 2004 г., предшествующей пятому конгрессу международной лишенологической ассоциации: предварительный отчет / В. Альструп, А. А. Заварзин, Я. Коцоуркова [и др.] – Биогеография Карелии // Труды Карельского научного центра РАН. – 2005. – Выпуск № 7. – С. 3– 16.
7. Лишайники *Cladonia uncialis* как ценное сырье биосинтетических соединений против клинических штаммов бактерий и грибов / Х. Томчак, Н. Малиньска, М. Вроньска [и др.] // Acta biochimica Polonica. – 2019. – №66, Vol.4. – P.597– 603.

Сведения об авторах

В.С. Пересыпкина – школьник

А.А. Проскуряков – студент*

М.А. Гребенников – студент

О.А. Киселева – кандидат биологических наук, доцент

Information about the authors

V.S. Peresyapkina– student

A.A. Proskuryakov – student*

M.A. Grebennikov – student

O.A. Kiseleva – Candidate of Sciences (Biological), Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

prosk0202@mail.ru

УДК: 612.82

РАЗРАБОТКА РЕКОМЕНДАЦИЙ ПО НЕЙРОФИТНЕСУ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПАМЯТИ У ШКОЛЬНИКОВ

Пинигина Екатерина Дмитриевна, Матвеева Ирина Альбертовна

МАОУ СОШ № 4

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Состояние памяти является одним из важнейших условий успешности школьного обучения. По данным Минздрава России, у 60 % подростков обнаруживаются различные расстройства – быстрая утомляемость, проблемы с памятью. Существуют методы по улучшению работы головного мозга, в том числе по улучшению памяти. Нейрофитнес нужен для достижения выдающихся результатов, для улучшения внимания и