

М. В. Матвеевков

**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
HYROGIMNIA PHYSODES ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЭКСТРАКЦИИ
В ОТНОШЕНИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА (HaCAT)**

In vitro оценена способность трех экстрактов из лишайника *Hyrogymnia physodes* подавлять жизнеспособность стабильной клеточной линии кератиноцитов человека (HaCAT) в МТТ-тесте. Полученные дозы полунгибирования клеточной популяции позволили отнести исследованные экстракты к токсичным веществам в отношении данной линии кератиноцитов. Количественное изменение токсических свойств различных экстрактов одного и того же вида лишайника варьирует весьма слабо.

Изучение биологической активности лишайниковых веществ находит различные пути их использования в различных областях, в том числе – в медицине. Многочисленные исследования посвящены практическому использованию выделенных из лишайниковой биомассы экстрактов, так и отдельных веществ [1–3]. Среди опубликованных результатов исследований не редкими являются данные и об аллергенных и цитотоксических свойствах лишайниковых веществ, в том числе – в отношении стабильных неопухолевых клеточных линий. Например, исследования, проведенные в Финляндии и Скандинавии [4–6] зарегистрировали немногочисленные положительные реакции в патч-тестах на косметические средства, содержащие экстракт лишайника *Evernia prunastri*, а также на собственно экстракт и некоторые входящие в его состав вещества. Описано воздействие отдельных лишайниковых веществ (атранорин, усниновая, леканоровая и другие кислоты) и экстрактов из лишайников родов *Usnea*, *Cladonia*, *Evernia* и других на линию кератиноцитов человека (HaCAT) и эпителиальную линию (Vero) [7–10]. Линия HaCAT зарекомендовала себя как валидная модель эпидермального слоя кожи [11], при тестировании различного рода веществ. Более того, образуя внешний роговой слой и накапливая произведенный меланоцитами меланин, данные клетки являются эффективным физическим барьером, защищающим организм от воздействия внешних негативных факторов, повреждение которого может вызвать ряд нежелательных эффектов [12]. В связи с этим данная линия представляется наиболее пригодной при первичном скрининге дермотоксических свойств субстанций, выделенных из лишайников.

Таким образом, настоящее исследование посвящено скринингу цитотоксического действия ацетоновых экстрактов одного из наиболее распространенных лишайников юго-востока Беларуси на культуру клеток HaCAT.

Образцы лишайника *Hyrogymnia physodes* (L.) Nyl. (Syn. *Parmelia physodes* (L.) Ach.) отбирали в лесах Гомельского лесхоза. Высушенную до воздушно-сухого состояния и измельченную биомассу лишайника экстрагировали в аппарате Сокслета. Характеристики полученных субстратов следующие: Экстракт № 1 (растворитель – этанол, экстракция проводилась при $t = 78,3^{\circ}\text{C}$); Экстракт № 2 (растворитель – ацетон, экстракция проводилась при $t = 56,3^{\circ}\text{C}$); Экстракт № 3 (растворитель – ацетон, с предварительной холодной мацерацией гексаном в течение 7 суток, экстракция проводилась при $t = 56,3^{\circ}\text{C}$). Присвоенная экстрактам нумерация сохраняется при изложении экспериментальных данных. Полноту экстракции контролировали стандартным способом [13]. Для оценки цитотоксического эффекта использовали стабильную линию кератиноцитов HaCAT. Культивирование производилось согласно рекомендациям американской коллекции типовых культур (ATCC) [14]. Инкубация клеток с экстрактами в питательной среде проводилось в формате 96-луночного планшета, при следующих концентра-

циях: 0,78125-200 (мкг/мл). Для определения метаболической активности клеток использовали МТТ-тест [15]. Анализ результатов исследования производили с помощью программных продуктов GraphPad Prism (Version 5.02) и Microsoft Excel.

Полученные данные говорят о слабо варьирующем, стабильном цитотоксическом действии экстрактов, извлеченных из биомассы одного и того же вида лишайника, при различных способах его получения. Об этом можно судить по полуингибирующей метаболическую активность дозе, которая варьирует в пределах 19,51-19,70 мкг/мл (таблица 1). Данная устойчивость цитотоксической активности возможно связана с тем, что во всех исследуемых экстрактах основной действующий агент выходит из биомассы лишайника вне зависимости от способа его экстрагирования.

Таблица 1 – Цитотоксический эффект экстрактов из лишайника *Нурогумния phytodes* в отношении клеток линии HaCAT (IC₅₀, мкг/мл)

Номер экстракта	Средняя величина	Стандартное отклонение
1	19,59	±7,21
2	19,70	±4,53
3	19,51	±4,20

В качестве критерия цитотоксичности экстрактов из лишайников в отношении кератиноцитов использовали данные Национального института онкологии США (National cancer institute, NCI), согласно которым сырой экстракт считается активным при IC₅₀ < 30 мкг/мл [16, 17]. Таким образом, в отношении изучаемой культуры, вышеперечисленные экстракты можно отнести к токсическим.

Динамика снижения жизнеспособности имеет вид стандартной сигмоидной кривой (рисунок 1). Однако необходимо отметить присутствие резкого перехода клеток в фазу угнетения жизнеспособности (10 < мкг/мл). Это может говорить о некоем критическом накоплении или появлении, в определенной концентрации, токсического компонента, который вызывает энергонезависимую гибель клетки (путь онкоза), в результате которой в популяцию попадают хемотоксичные продукты, вызывающие обширные кластеры клеточной гибели [18].

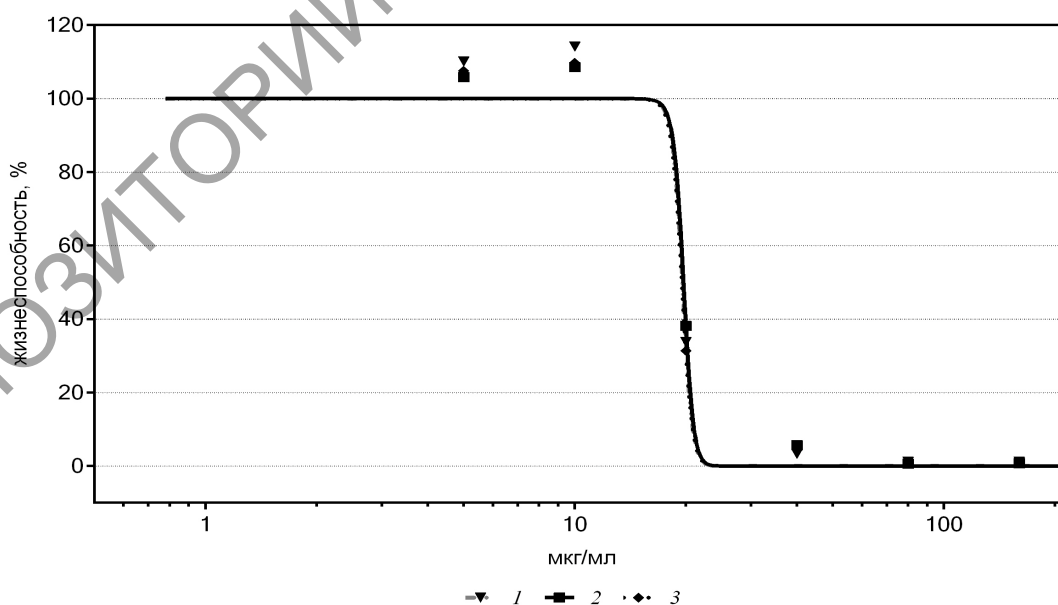


Рисунок 1 – Влияние концентрации экстрактов из лишайников на жизнеспособность клеток кератиноцитов человека

Таким образом, можно заключить, что экстракты из лишайника *Hypogymnia physodes* являются токсичными в отношении стабильной культуры кератиноцитов человека HaCaT. Угнетение жизнеспособности имеет однонаправленный характер, что возможно зависит от извлечения главного токсического агента при различных способах его экстракции. Кривые «доза-эффект» имеют выраженный резкий переход в фазу угнетения жизнеспособности.

Литература

- 1 Recent Advances in Lichenology: in 2 vol. / ed.: D. K. Upreti [et al.] – New Delhi: Springer, 2015. – Vol. 2. – XV, 265 p.
- 2 Ranković, B. Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential / B. Ranković. – Cham: Springer International Publishing, 2015. – V, 202 p.
- 3 The Multiple Properties of Some of the Lichenized Ascomycetes: Biological Activity and Active Metabolites // Plant Adaptation Strategies in Changing Environment / V. Shukla [et al.] – Singapore: Springer, 2017. – Ch. 8. – P. 201–234.
- 4 Johansen, J. D. Oak moss extracts in the diagnosis of fragrance contact allergy / J. D. Johansen, S. Heydorn, T. Menné // Contact Dermatitis. – 2002. – Т. 46, № 3. – С. 157–161.
- 5 The Scandinavian multicenter photopatch study 1980–1985 / P. Thune [et al.] // Photo-dermatology. – 1988. – Т. 5, № 6. – С. 261–269.
- 6 Aalto-Korte K. Occupational allergic contact dermatitis from lichens in present-day Finland / K. Aalto-Korte, A. Lauerma, K. Alanko // Contact Dermatitis. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 36–38.
- 7 Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds / B. Burlando [et al.] // Planta medica. – 2009. – Т. 75, № 06. – С. 607–613.
- 8 14 Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B 4 biosynthesis and HaCaT cell growth, 2. Novel analogues of obtusatic acid / S. K. KC, K. Müller // European journal of medicinal chemistry. – 2000. – Т. 35, № 4. – С. 405–411.
- 9 Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E 2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes / K. Engel [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2007. – Т. 89, № 1. – С. 9–14.
- 10 Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines / C. Bézivin [et al.] // Phytomedicine. – 2003. – Т. 10, № 6–7. – С. 499–503.
- 11 Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line / P. Boukamp [et al.] // The Journal of cell biology. – 1988. – Vol. 106, № 3. – P. 761–771.
- 12 Proksch, E. The skin: an indispensable barrier / E. Proksch, J. M. Brandner, J. M. Jensen // Experimental dermatology. – 2008. – Vol. 17. – №. 12. – P. 1063–1072.
- 13 Воскресенский, П. И. Техника лабораторных работ / П. И. Воскресенский. – М.: Химия, 1973. – 717 с.
- 14 American Type Culture Collection [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.atcc.org/>. – Дата доступа: 09.01.2018.
- 15 Berridge, M. V., Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction / M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan // Biotechnology annual review. – 2005. – Vol. 11. – P. 127–152.
- 16 Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species / T. Mitrović [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2011. – Vol. 12. – № 8. – P. 5428–5448.
- 17 In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer / A. Itharat [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2004. – Vol. 90. – P. 33–38.
- 18 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // Toxicologic pathology. – 2007. – Vol. 35. – № 4. – P. 495–516.