

УДК 576.5:630*813.2:582.29

О. М. Храмченкова¹, М. В. Матвеевков²

¹Кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры ботаники и физиологии растений,
УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»,
г. Гомель, Республика Беларусь

²Аспирант лаборатории комбинированных воздействий,
ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»,
г. Гомель, Республика Беларусь

Научный руководитель: Храмченкова Ольга Михайловна, кандидат биологических наук, доцент

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

In vitro оценивали подавление жизнеспособности культур клеток HaCAT, MCF-7, HeP-2C и A-549 экстрактами лишайников *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Биомассу лишайников экстрагировали этанолом. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для HaCAT были токсичными экстракты *H. physodes* и *C. arbuscula*; для MCF-7 – экстракты *H. physodes*; для HeP-2C – экстракты *C. arbuscula*, *E. prunastri* и *R. pollinaria*; для A-549 – экстракты *C. arbuscula*, *H. physodes* и *X. parietina*. Экстракты *C. arbuscula* не проявили выраженного цитотоксического действия только в отношении линии MCF-7; экстракты *H. physodes* – только в отношении HeP-2C. Снижение жизнеспособности клеточных культур при возрастании концентрации экстрактов лишайников удовлетворительно описывается S-образной кривой. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения экстрактов лишайников для коррекции жизнеспособности стабильных и опухолевых клеток человека в экспериментальных условиях.

Ключевые слова: *Cladonia arbuscula*; *Evernia prunastri*; *Hypogymnia physodes*; *Ramalina pollinaria*; *Xanthoria parietina*; этанольные экстракты лишайников; культуры клеток; HaCAT; MCF-7; HeP-2C; A-549; полунгибирующая концентрация (IC₅₀); цитотоксичность.

Введение

Особенности физиологии и экологии лишайников, а также характер взаимодействия между микобионтом и фотобионтом способствуют синтезу в слоевищах вторичных метаболитов, обеспечивающих защиту от негативных факторов внешней среды [1]. Вторичные метаболиты накапливаются на поверхности гиф микобионта лишайника, отличаются химической стабильностью и гидрофобностью [1], [2]. Известно более 1100 вторичных метаболитов лишайников, причём только около пятидесяти из них встречаются также у нелихенизированных грибов и растений [3]. Лишайниковые вещества обладают высокой биологической активностью [1], [4]–[7].

В настоящее время достигнут определённый прогресс в области выделения, идентификации и определения физико-химических свойств лишайниковых веществ [3], [5], [8]. Вместе с тем актуальной и нерешённой задачей является исчерпывающее описание состава вторичных метаболитов каждого конкретного вида лишайников. Почти отсутствует и сильно варьирует информация о количественном содержании различных вторичных метаболитов в талломах, их долевым соотношении в пределах того или иного вида экстракта, влиянии на данные показатели внешних и внутренних факторов. Более того точно не известно, насколько совпадает состав экстрактов, полученных при помощи одного и того же экстрагента из образцов одного и того же вида лишайников, собранных в различных или схожих местах обитания, географически удалённых друг от друга. Весьма важным в контексте оценки возможного биотехнологического потенциала лишайников является выбор растворителей для получения экстрактов с определёнными свойствами, а также изучение их цитотоксической активности [9]–[12].

Исследования цитотоксичности экстрактов лишайников ведутся во многих исследовательских центрах [13]–[18]. По результатам скрининга экстрактов лишайников и отдельных вторичных метаболитов можно видеть количественные различия в цитотоксичности комплексов веществ, выделенных тем или иным экстрагентом. Такие различия могут объясняться качественным или количественным составом метаболитов, экстрагированных тем или иным растворителем, или свидетельствовать о важности комплексного вклада различных веществ, в том числе – минорных

компонентов в реализацию биологического эффекта. В большинстве случаев отдельно взятые лишайниковые вещества (выделенные или синтезированные) не воспроизводят биологические эффекты, установленные для экстрактов лишайников.

Ранее нами были показаны цитотоксические свойства ацетоновых экстрактов четырёх распространенных видов лишайников юго-востока Беларуси [19], [20].

Целью настоящей работы было описание цитотоксических свойств этанольных экстрактов пяти распространенных видов лишайников.

Методы исследования

Получение экстрактов лишайников. Исследовались пять видов лишайников, широко распространённых в лесах юго-востока Беларуси – *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot.; *Evernia prunastri* (L.) Ach.; *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.; *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. Биомассу лишайников отбирали в лесах Государственного лесохозяйственного учреждения «Гомельский лесхоз» на типичных для каждого вида субстратах, высушивали, измельчали, экстрагировали в аппарате Сокслета. Растворитель удаляли с помощью ротационного испарителя. Сухие экстракты хранили при температуре минус 18 °С. Экстракты представляли собой сухие порошки жёлто-коричневого цвета с сильным запахом. Выход экстрактов составлял $1,7 \pm 0,28$; $10,1 \pm 1,88$; $15,1 \pm 1,31$; $12,2 \pm 1,75$ и $3,8 \pm 0,95$ % воздушно-сухой массы лишайника для *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina*, соответственно.

Подготовка стабильных клеточных линий. Использовали перевиваемую культуру кератиноцитов человека (HaCAT), а также эпителиоподобную опухолегенную клеточную линию MCF-7; культуру клеток эпидермоидной карциномы человека HeP-2C и эпителиальную линию опухолевых клеток A-549. Культуры клеток были получены в НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Режим культивирования стандартный: 37 °С, 90 % – влажность воздуха с 5 % содержанием CO₂, коэффициент субкультивирования – 1/5. Состав среды: DMEM/F-12, 11039 GIBCO; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин-В; 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, HiCloneInc [21].

Инкубация клеток с экстрактами лишайников. В ячейки 96-луночного планшета вносили 100 мкл клеточной суспензии (3000 клеток), инкубировали 24 часа при 37 °С и 5 % CO₂. Навеску экстракта лишайника массой 40 мг растворяли в 2 мл диметилсульфоксида (ДМСО), центрифугировали (21000 g, 5 мин.), после чего 40 мкл раствора вносили в 2 мл полной инкубационной среды. Серийное разведение экстракта раствором инкубационной среды позволило получить градиент концентраций (мкг/мл): 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 и 1,5625. Полученные растворы экстракта в количестве 100 мкл вносили в лунки планшета, содержащие 100 мкл питательной среды. Конечный градиент концентраций экстрактов лишайников составил: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 и 0,78125 (мкг/мл), наиболее высокая концентрация ДМСО (1 %) была в разведении 200 мкг/мл. Контроль выращивали в идентичной питательной среде без добавления экстрактов лишайников. Время инкубации клеток с экстрактами лишайников – 48 часов, суммарное время культивирования клеток в планшете – 72 часа. Инкубация проводилась в соответствии с рекомендацией протокола [21].

Определение метаболической активности клеток проводили с использованием теста на скорость восстановления 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, M5655, Sigma) до формазана [22]. После инкубации клеток с испытуемым экстрактом лишайников питательную среду удаляли, дважды промывали ячейки фосфатно-солевым буфером, добавляли раствор питательной среды, содержащий 0,05 % МТТ, после чего два часа инкубировали клетки при 37 °С и 5 % CO₂. Инкубационную среду удаляли, вносили 200 мкл смеси этанол: ДМСО (1:1), содержимое перемешивали до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора формазана измеряли при $\lambda = 570$ нм с использованием планшетного спектрофотометра Tecan Safire (Швейцария), для нормализации данных применяли измерения при $\lambda = 700$ нм. Данный тест отражает жизнеспособность популяции клеток в целом и не раскрывает механизмов клеточной гибели, но является общепринятым при определении цитотоксичности данной субстанции в отношении культуры клеток [23].

Жизнеспособность клеток вычисляли по формуле:

$$\text{жизнеспособность} = \left(\frac{OD_{570} \text{ контрольных лунок}}{OD_{570} \text{ опытной лунки}} \right) \times 100 \%,$$

где OD_{570} – оптическая плотность раствора формазана, измеренная при $\lambda = 570$ нм.

Анализ результатов исследования производили с помощью программных продуктов GraphPad Prism (Version 5.02) и Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

В качестве критерия токсичности экстрактов для культур клеток использовали рекомендации Института рака США [24], согласно которым сырой экстракт считается активным при полуингибирующей концентрации – $IC_{50} < 30$ мкг/мл. Диапазон полуингибирующих концентраций экстрактов лишайников в отношении клеточных культур был весьма широким: $IC_{50} = 7 \div 161$ мкг/мл (таблица 1).

Таблица 1. – Цитотоксический эффект этанольных экстрактов лишайников в отношении культур клеток, оцененный с помощью МТТ-теста после 48 часов экспозиции (IC_{50} , мкг/мл)

Вид лишайников	HaCAT	MCF-7	HeP-2C	A-549
<i>C. arbuscula</i>	12,1 ± 1,08	59,4 ± 12,95	29,9 ± 2,65	29,8 ± 7,69
<i>E. prunastri</i>	113,1 ± 6,41	64,1 ± 8,22	29,5 ± 1,58	90,5 ± 3,43
<i>H. physodes</i>	19,6 ± 7,22	7,1 ± 0,33	36,8 ± 0,90	19,1 ± 2,22
<i>R. pollinaria</i>	63,1 ± 9,13	58,5 ± 6,47	22,6 ± 1,38	69,4 ± 4,48
<i>X. parietina</i>	161,3 ± 41,32	82,0 ± 8,68	111,8 ± 10,46	23,1 ± 1,99

Как стабильные, так и опухолегенные культуры клеток обладают существенно отличающейся чувствительностью к этанольным экстрактам изучаемых видов лишайников. Установлено, что в отношении культуры кератиноцитов (HaCAT) токсичными были экстракты *C. arbuscula* и *H. physodes*; в отношении MCF-7 – экстракт *H. physodes*; HeP-2C – экстракты *C. arbuscula*, *E. prunastri* и *R. pollinaria*; A-549 – *C. arbuscula*, *H. physodes* и *X. parietina*. Цитотоксичность экстрактов лишайников в отношении культуры HaCAT является препятствием для их практического применения, тогда как проявление данного свойства в отношении культур опухолевых клеток MCF-7, HeP-2C и A-549 является предпосылкой для разработки противоопухолевых препаратов на основе лишайникового сырья [4]–[7].

Таким образом, используемые нами опухолегенные культуры можно расположить по мере снижения их чувствительности к экстрактам следующим образом: HeP-2C > A549 > MCF-7. Сравнивая показатели полуингибирующих доз этанольных экстрактов с таковыми полученными нами для ацетоновых [19], [20], можно видеть, что в отношении культур HaCAT и A-549 этанольные и ацетоновые экстракты *C. arbuscula* и *H. physodes* были почти в равной степени цитотоксичными, тогда как экстракты *R. pollinaria* – не токсичными. То же можно сказать о цитотоксичности этанольных и ацетоновых экстрактов *H. physodes* и *R. pollinaria* в отношении линии MCF-7; экстрактах *C. arbuscula*, *E. prunastri* и *H. physodes* в отношении линии HeP-2C. В ряде случаев этанольные экстракты лишайников оказались не токсичными в отношении клеточной культуры, тогда как ацетоновые – токсичными: экстракты *E. prunastri* – в отношении HaCAT, MCF-7 и A-549; экстракт *C. arbuscula* – в отношении MCF-7. Наконец, выявлено два случая, когда этанольный экстракт оказался цитотоксичным, а ацетоновый – не токсичным: экстракт *X. parietina* – в отношении A-549 и экстракт *R. pollinaria* – в отношении HeP-2C. Здесь мы впервые сообщаем об отсутствии цитотоксичности ацетоновых экстрактов *X. parietina* в отношении клеточных культур: HaCAT – 121,5 ± 7,6 мкг/мл; MCF-7 – 125,9 ± 9,94 мкг/мл; HeP-2C – 131,9 ± 9,14 мкг/мл; A549 – 58,3 ± 2,25 мкг/мл.

Изменение жизнеспособности клеточных популяций при увеличении концентрации экстракта в питательной среде в большинстве случаев описывается стандартной сигмоидной кривой, с коэффициентом аппроксимации порядка 0,9–0,99 (рисунки 1–4).

Для культуры кератиноцитов человека HaCaT наименее токсичными были экстракты *E. prunastri* и *R. pollinaria* (рисунок 1).

Кривые выживаемости клеток при внесении данных экстрактов в питательную среду были схожими: имели место стимуляция клеток при концентрациях экстрактов лишайников до 30 мкг/мл, и снижение их жизнеспособности до нуля по мере роста концентрации экстрактов. Экстракт *R. pollinaria* более выраженно стимулировал клетки в субтоксичном диапазоне концентраций и сильнее подавлял их жизнедеятельность в сублетальном диапазоне концентраций. Особенности действия экстракта *H. physodes* на культуру клеток HaCaT проявлялись в виде небольшой стимуляции их метаболической активности при концентрациях ниже 20 мкг/мл и резком подавлении жизнедеятельности клеток при более высоких концентрациях экстракта. Экстракт *C. arbuscula* проявлял стимулирующее действие на кератиноциты при концентрациях до 3 мкг/мл, тогда как при более высоких значениях данного показателя происходило довольно быстрое снижение жизнеспособности клеток. Экстракт *X. parietina* не оказывал выраженного токсического действия на культуру кератиноцитов. Особенности зависимости жизнеспособности клеток от концентрации данного экстракта являются отсутствие эффекта стимуляции метаболизма в субтоксичном диапазоне концентраций и недостижение летальных эффектов при концентрациях до 200 мкг/мл.

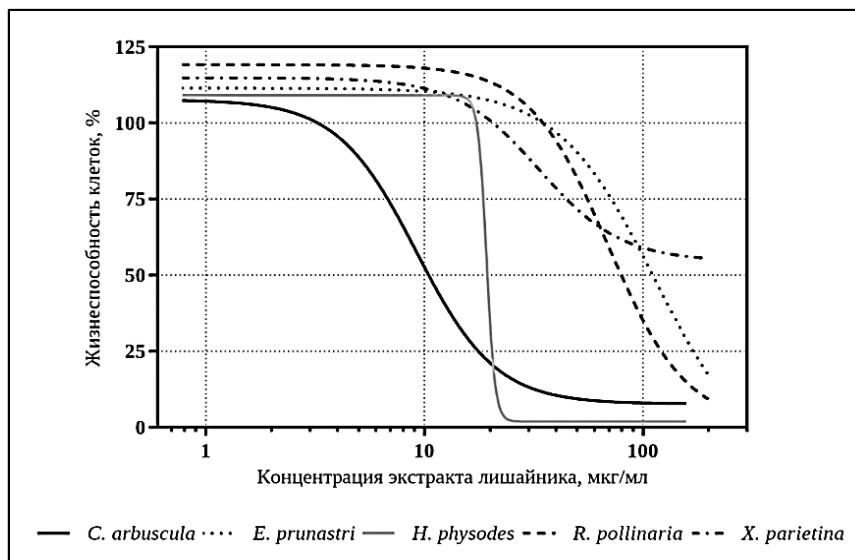


Рисунок 1. – Влияние концентрации этанольных экстрактов лишайников на жизнеспособность культуры кератиноцитов человека (HACaT)

Среди этанольных экстрактов лишайников сугубо токсичным в отношении клеток эпителиоподобной опухолегенной линии MCF-7 был экстракт *H. physodes* (рисунок 2).

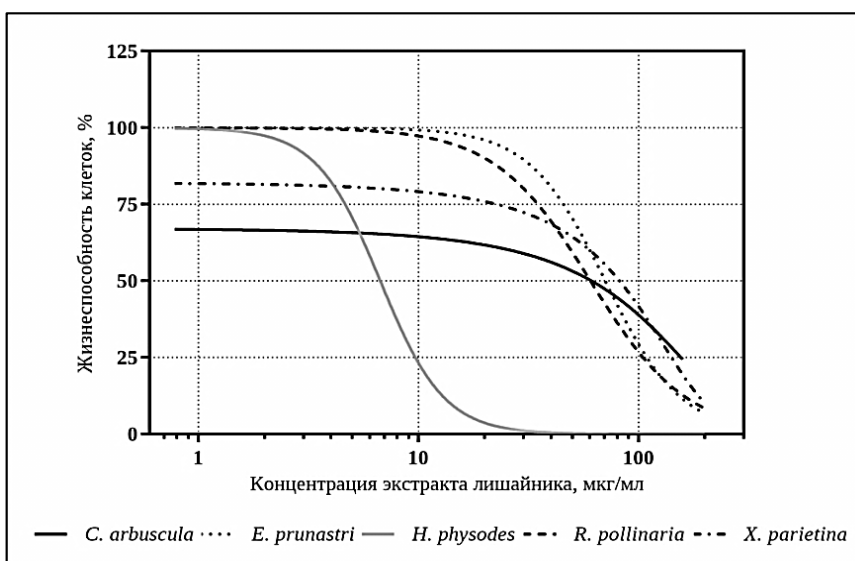


Рисунок 2. – Влияние концентрации этанольных экстрактов лишайников на жизнеспособность клеток эпителиоподобной опухолегенной линии MCF-7

Данный экстракт характеризовался субтоксичным диапазоном концентраций до 2 мкг/мл, тогда как при десятикратном увеличении концентрации жизнеспособность опухолевых клеток MCF-7 снижалась до нуля. Экстракты *E. prunastri* и *R. pollinaria* схожим образом действовали на клетки линии MCF-7. Однако, токсическое действие экстракта *R. pollinaria* начинало проявляться при концентрациях выше 10 мкг/мл, тогда как *E. prunastri* – при 20 мкг/мл. Характерным было действие экстрактов *C. arbuscula* и *X. parietina*. Данные экстракты понижали жизнеспособность клеток линии MCF-7 до 60 ÷ 80 % при концентрациях ниже 1 мкг/мл; при дальнейшем повышении концентрации заметного цитотоксического действия не отмечалось; при приближении к полулетальным значениям концентраций экстрактов их токсическое действие стремительно нарастало; летальные значения концентраций оказались близкими к величинам, полученным для экстрактов *E. prunastri* и *R. pollinaria*.

Клетки культуры эпидермоидной карциномы человека HeP-2C были наиболее чувствительными к цитотоксическому действию этанольных экстрактов лишайников (рисунок 3). Даже экстракт *H. physodes*, по показателю IC_{50} не относящийся к цитотоксичным, при концентрациях около 40÷50 мкг/мл ингибировал жизнедеятельность клеток HeP-2C на 90 %. Влияние концентраций этанольных экстрактов *C. arbuscula* и *E. prunastri* на жизнедеятельность клеток культуры HeP-2C было практически одинаковым; довольно схожим было действие экстракта *R. pollinaria*. Экстракт *X. parietina* не оказал выраженного токсического действия на культуру эпидермоидной карциномы человека HeP-2C.

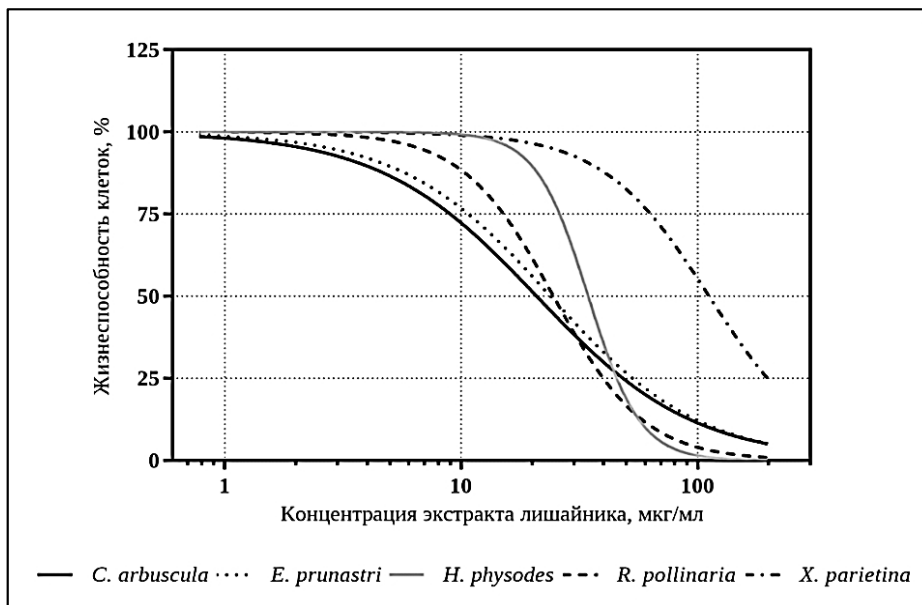


Рисунок 3. – Влияние концентрации этанольных экстрактов лишайников на жизнеспособность клеток эпидермоидной карциномы человека HeP-2C

В отношении эпителиальной линии опухолевых клеток A-549 цитотоксических свойств не проявляли экстракты *E. prunastri* и *R. pollinaria* (рисунок 4). Для данной клеточной линии характерен эффект, обнаруженный для культуры MCF-7: токсическое действие экстракта *R. pollinaria* начинало проявляться при концентрациях выше 10 мкг/мл, тогда как *E. prunastri* – при 20 мкг/мл.

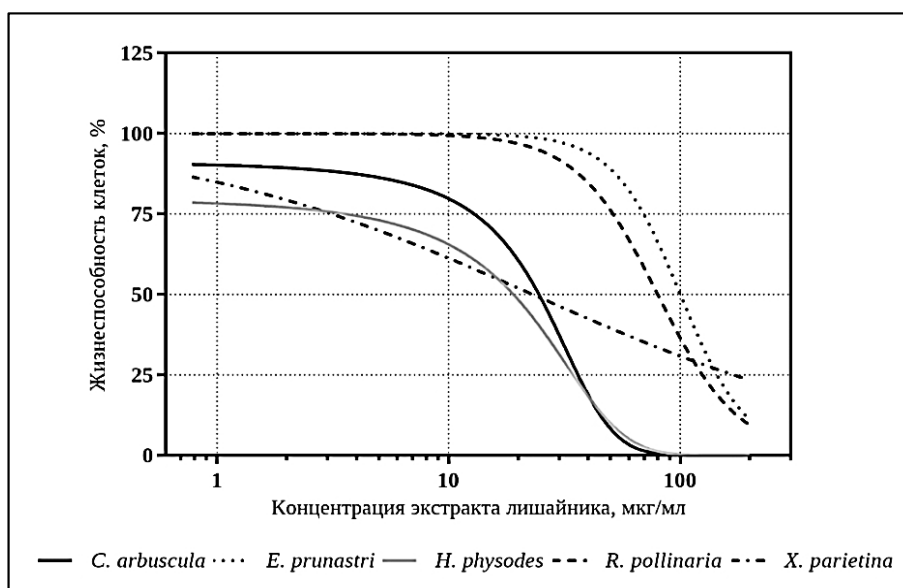


Рисунок 4. – Влияние концентрации этанольных экстрактов лишайников на жизнеспособность эпителиальной линии опухолевых клеток A-549

В отношении клеток линии А-549 довольно схожим было действие экстрактов *C. arbuscula* и *H. physodes*. При концентрации экстрактов до $3 \div 7$ мкг/мл жизнеспособность клеток подавлялась на $10 \div 25$ %; при концентрациях, предстоящих IC_{50} , существенного снижения метаболической активности клеточной культуры не наблюдалось; по мере роста концентрации до IC_{50} и выше цитотоксическое действие экстрактов *C. arbuscula* и *H. physodes* на клетки А-549 становилось все более одинаковым. Характер влияния концентрации этанольных экстрактов *X. parietina* на клеточную культуру А-549 выражался практически линейной зависимостью. При концентрациях экстракта ниже 1 мкг/мл жизнеспособность клеток была снижена на 20 %; при концентрациях выше 100 мкг/мл жизнеспособность клеток не превышала 20 % от контроля.

Выявленные отличия цитотоксических свойств этанольных экстрактов лишайников в отношении неопухолевых и опухолевых клеточных культур в определенной степени могут быть объяснены составом вторичных метаболитов лишайников, находящихся в талломах [25], [26] и в той или иной степени извлекаемых из них этанолом.

Химический выход этанольных экстрактов из биомассы изучаемых видов лишайников вполне достаточен для того, чтобы предполагать наличие в экстрактах значимого количества вторичных метаболитов. Во всяком случае для усниновой кислоты нами такие результаты получены [27]. Очевидно, что этанольные экстракты биомассы лишайников, равно как и любые другие экстракты, содержат в своем составе все вещества, растворимые в этаноле в условиях экстрагирования.

Обращает на себя внимание сравнительная схожесть кривых выживания всех клеточных культур, где вносились экстракты из *E. prunastri* и *R. pollinaria*. Сходство можно объяснить присутствием усниновой и эверновой кислот в экстрактах, а различия – наличием атранорина у эвернии сливовой и их отсутствием у рамалины пыльцеватой. Схожесть кривых выживания культур клеток эпидермоидной карциномы человека HeP-2C при действии экстрактов *C. arbuscula* и *E. prunastri* – наличием усниновой кислоты в экстрактах, а различия – присутствием других вторичных метаболитов.

Особенный характер кривых выживания всех клеточных культур, где вносились экстракты *C. arbuscula*, *H. physodes* и *X. parietina*, по-видимому, связан с уникальным для каждого экстракта составом метаболитов [25], [26]. Спиртовые экстракты *H. physodes* были токсичны для всех изучаемых клеточных линий, за исключением HeP-2C. Мы склонны связывать этот факт с влиянием на клетки комплекса физодовых и физодоловой кислот, а не атранорина, или протоцетраровой кислоты. Атранорин присутствует также в талломах эвернии сливовой, но экстракты данного лишайника не токсичны для клеток линий HaCAT, MCF-7 и А-549. Содержащийся в экстрактах *X. parietina* антрахинон париедин избирательно ингибировал клетки линии А-549 и не являлся токсичным для других клеточных культур. Возможно, зарегистрированные нами эффекты действия спиртового экстракта ксантории настенной на клеточные культуры различных линий связаны не с париедином, а с другими антрахинонами или веществами иной природы (аллантиин, таурин, различные стероиды), содержащимися в лишайнике [25], [26].

Заключение

Оценивали цитотоксическое действие этанольных экстрактов из пяти видов лишайников Беларуси на опухолегенные и стабильные клеточные линии. Для линии эпителиальных клеток человека HaCAT токсичными были экстракты *C. arbuscula* и *H. physodes*; для культуры MCF-7 – экстракты из *H. physodes*; для HeP-2C – экстракты из *C. arbuscula*, *E. prunastri* и *R. pollinaria*; для А-549 – экстракты *C. arbuscula*, *H. physodes* и *X. parietina*. Экстракты *R. pollinaria* и *E. prunastri* оказались токсичными только для культуры HeP-2C; экстракты *X. parietina* – только для культуры А-549. Экстракты *C. arbuscula* не проявили выраженного токсического действия только для культуры MCF-7; экстракты *H. physodes* – только для HeP-2C.

Жизнеспособность клеточных популяций при возрастании концентрации экстракта из лишайника в большинстве случаев описывается стандартной сигмоидной кривой, только при действии экстракта *X. parietina* на культуру клеток А-549 вид зависимости линейный. Экстракты лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* стимулировали жизнедеятельность кератиноцитов человека (HaCAT) при субтоксичных концентрациях.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки способов коррекции жизнеспособности стабильных и опухолевых клеток человека.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Nash III, T. H. Lichen biology / T. H. Nash III. – Cambridge University Press, 1999. – 486 p.
2. Molnár, K. Depsides and depsidones in populations of the lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity / K. Molnár, E. Farkas // Ann. Bol. Fennici. – 2011. – Vol. 48. – P. 473–482.
3. Huneck, S. Identification of lichen substances / S. Huneck, I. Yoshimura. – Berlin : Springer, 1996. – 493 p.
4. Shukla, V. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review / V. Shukla, G. P. Joshi, M. S. Rawat // Netherlands : Springer : Phytochemistry Reviews, 2010. – Vol. 9 (2). – P. 303–314.
5. Recent Advances in Lichenology : in 2 vol. / ed.: Upreti D. K. [et al.]. – New Delhi : Springer, 2015. – Vol. 2. – XV, 265 p.
6. Ranković, B. Lichen secondary metabolites : bioactive properties and pharmaceutical potential / B. Ranković. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – V, 202 p.
7. 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.
8. Elix, J. A. A Catalogue of Standardized Thin Layer Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances / J. A. Elix. – Canberra : Australian National University, 2014. – 330 p.
9. Lichenic extracts and metabolites as UV filters / F. Lohézic-Le Dévéhat [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology. – 2013. – Vol. 120. – P. 17–28.
10. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens / F. Rancan [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology. – 2002. – Vol. 68 (2–3). – P. 133–139.
11. Antimicrobial activity of methanol extracts of four Parmeliaceae lichen species / I. Stojanović [et al.] // Facta universitatis. Series : Physics, Chemistry and Technology. – 2013. – Vol. 11 (1). – P. 45–53.
12. Larvicidal Activity of *Cladonia substellata* Extract and Usnic Acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina* / R. R. Bomfim [et al.] // Lat. Am. J. Pharm. – 2009. – Vol. 28 (4). – P. 580–584.
13. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines / E. Studzińska-Sroka [et al.] // Pharm Biol. – 2016. – Vol. 54 (11). – P. 2480–2485.
14. Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten *Parmeliaceae* Lichen Species / C. Fernández-Moriano [et al.] // Evid Based Complement Alternat Med. – 2016. – Vol. 16. – P. 1–11.
15. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite / M. G. Melo [et al.] // Toxicology in Vitro. – 2011. – Vol. 25. – P. 462–468.
16. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential / Xu M. [et al.]. – Netherlands : Elsevier : Phytomedicine. – 2016. – Vol. 23 (5). – P. 441–459.
17. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines / C. Bézivin [et al.] // Phytomedicine. – 2003. – Vol. 10. – P. 499–503.
18. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia/ M. Kosanić [et al.] // EXCLI Journal. – 2014. – Vol. 13. – P. 1226–1238.
19. Храменкова, О. М. Цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов из лишайников в отношении линии кератиноцитов человека HaCAT / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // Изв. Гомел. гос. ун-та им. Ф. Скорины. – 2018. – № 3 (108). – С. 81–86.
20. Храменкова, О. М. Цитотоксическая активность экстрактов из четырех видов лишайников в отношении культур опухолевых клеток / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. – 2018. – № 2. – С. 88–98.
21. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay // Cancer cell culture: methods and protocols / J. van Meerloo [et al.] – New York : Human Press, 2011. – Ch. 20. – P. 237–245.
22. 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.
23. 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.
24. CNALH [Electronic resource]. 2019. – Mode of access: <https://lichenportal.org>. – Date of access: 28.11.2019).

25. The Lichens of Great Britain and Ireland. 2nd ed. / Eds.: C. W. Smith [et al.]. – London : British Lichen Society, 2009. – 700 p.

26. Brodo, I. M. Lichens of North America / I. M. Brodo, S. D. Sharnoff, S. Sharnoff. – New Haven : Yale University Press, 2001. – 828 p.

27. Храмченкова, О. М. Анализ эффективности извлечения усниновой кислоты из лишайников Белорусского Полесья / О. М. Храмченкова, Р. И. Новиков // Бюллетень науки и практики. Электрон. журн. – 2018. – Т. 4., № 6. – С. 23–32.

Поступила в редакцию 18.11.2020

E-mail: hramchenkova@gsu.by;
matvey.matveenkov@mail.ru

V. M. Khramchankova, M. V Matveyenkau

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ETHANOL LICHENS EXTRACTS AGAINST CELL CULTURES

In vitro evaluated the ability of ethanol extract from lichen species *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, and *Xanthoria parietina* to inhibit the viability of cell lines. Lichen biomass was extracted with ethanol. To assess cell viability, an MTT test was made. Extracts from *H. physodes* and *C. arbuscula* were cytotoxic against cell lines HaCAT; extracts from *H. physodes* were cytotoxic against cell lines MCF-7; extracts from *C. arbuscula*, *E. prunastri* and *R. pollinaria* were cytotoxic against cell lines HeP-2C; extracts from *C. arbuscula*, *H. physodes* and *X. parietina* were cytotoxic against cell lines A-549. *C. arbuscula* extracts did not show a pronounced cytotoxic effect only against the MCF-7 cell line; *H. physodes* extracts - only for HeP-2C. The decrease in cell viability with increasing of lichen extracts concentration is described by the S-curve. Thus, lichen extracts can be used to correct the viability of stable and tumor human cells under experimental conditions.

Keywords: *Cladonia arbuscula*; *Evernia prunastri*; *Hypogymnia physodes*; *Ramalina pollinaria*; *Xanthoria parietina*; ethanol lichen extracts; cell culture; HaCAT; MCF-7; HeP-2C; A-549; half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}); cytotoxicity.