

## Цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов из лишайников в отношении линии кератиноцитов человека HaCAT

О.М. ХРАМЧЕНКОВА<sup>1</sup>, М.В. МАТВЕЕНКОВ<sup>2</sup>

С помощью МТТ-теста оценена чувствительность стабильной клеточной линии кератиноцитов человека (HaCAT) к ацетоновым экстрактам из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula*. Установлено, что ацетоновые экстракты из *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* токсичны для культуры клеток кератиноцитов человека. Экстракт из *Ramalina pollinaria* не токсичен для клеток HaCAT. Наиболее чувствительны клетки кератиноцитов человека к экстракту из *Cladonia arbuscula* и *Evernia prunastri*, наименее чувствительны – к экстракту из *Ramalina pollinaria*.

**Ключевые слова:** экстракты из лишайников; культуры клеток; жизнеспособность; полуингибирующая концентрация (IC<sub>50</sub>); цитотоксичность.

Using the MTT test, the sensitivity of the stable human keratinocyte cell line (HaCAT) to acetone extracts from lichens *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* and *Cladonia arbuscula* was evaluated. It has been established that acetone extracts from *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* and *Cladonia arbuscula* are toxic to human keratinocyte cell culture. The extract from *Ramalina pollinaria* is not toxic to HaCAT cells. The most sensitive cells are human keratinocytes to the extract from *Cladonia arbuscula* and *Evernia prunastri*, the least sensitive to the extract from *Ramalina pollinaria*.

**Keywords:** lichen extracts; cell lines; viability; half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>); cytotoxicity.

**Введение.** Широкий скрининг биологической активности лишайниковых веществ позволил выявить различные пути их использования в различных областях, в том числе – в медицине. Исследования многих лабораторий во всем мире посвящены поиску возможностей практического применения как различных экстрактов из лишайников, так и выделенных из них вторичных метаболитов [1]–[3]. Индивидуальные лишайниковые вещества и полученные различным путем экстракты из лишайников никоим образом не могут заменить друг друга, так как их свойства существенно отличаются. В настоящее время получено множество экспериментальных данных, свидетельствующих о противоопухолевой, противовоспалительной, антиоксидантной и антибактериальной активности лишайниковых веществ, сводка которых представлена, например, в обзорах [4]–[7]. Среди опубликованных результатов исследований не редкими являются данные об аллергенных и цитотоксических свойствах лишайниковых веществ, в том числе – в отношении стабильных неопухолевых клеточных линий. Так, исследования, проведенные в Финляндии и Скандинавии [8]–[10], зарегистрировали многочисленные 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. Существуют данные об аллергенных дерматитах у сборщиков лишайников рода *Cladonia* [11], однако, согласно тесту FCA, биомасса того же рода лишайников охарактеризована как умеренный раздражитель [12].

Кератиноциты – основные клетки эпидермиса кожи человека, составляющие около 90 % всех клеток эпидермиса. Они содержатся в базальном, шиповатом, зернистом, блестящем, роговом слоях эпидермиса. На данный момент существуют весьма разрозненные и сильно различающиеся данные (в силу применения различных методик и клеточных линий), описывающие 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) [13]–[16]. Линия HaCAT зарекомендовала себя как валидная модель эпидермального слоя кожи человека при тестировании различного рода веществ [17]. Более того, образуя внешний роговой слой и накапливая произведенный меланоцитами меланин, данные клетки являются эффек-

тивным физическим барьером, защищающим организм от воздействия внешних негативных факторов, повреждения которого может вызвать ряд нежелательных эффектов [18]. В связи с этим данная линия представляется наиболее пригодной при первичном скрининге дерматоксических свойств субстанций, выделенных из лишайников.

Настоящее исследование посвящено скринингу цитотоксического действия ацетоновых экстрактов из четырех наиболее распространенных лишайников юго-востока Беларуси на культуру клеток HaCAT.

**Методы исследований.** *Получение экстрактов вторичных метаболитов лишайников.* Для исследования были выбраны виды лишайников, часто встречающиеся на юго-востоке Беларуси, с описанным составом вторичных метаболитов, два из которых являются стандартными при аналитическом определении лишайниковых веществ [19]–[22] – *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. Биомассу лишайников отбирали на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз» на типичных для каждого вида субстратах. Слоевища эпифитных видов (*Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria*) отбирали вместе с фрагментом субстрата (корки сосны обыкновенной, березы повислой и дуба черешчатого, соответственно); эпигейный вид *Cladonia arbuscula* собирали на почве в сухом средневозрастном сосняке. Массу лишайников отделяли от субстрата, у *Cladonia arbuscula* – отбрасывали нижнюю часть подцеиев, – около 5 мм, сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали. Биомассу лишайников экстрагировали ацетоном в аппарате Сокслета, полноту экстракции контролировали стандартным способом [23]. Растворитель удаляли с помощью ротационного испарителя. Выход экстрактов в процентах воздушно-сухой массы лишайника составил: экстракт 1 – *Hypogymnia physodes* –  $12,8 \pm 0,49$ ; экстракт 2 – *Evernia prunastri* –  $11,5 \pm 0,57$ ; экстракт 3 – *Ramalina pollinaria* –  $11,3 \pm 0,56$ ; экстракт 4 – *Cladonia arbuscula* –  $3,7 \pm 0,21$ . Сухие экстракты хранили при комнатной температуре. Присвоенная экстрактам нумерация в настоящей работе сохраняется при изложении экспериментальных данных.

*Подготовка стабильных клеточных линий.* Использовали эпителиальные клетки человека линии HaCAT (кератиноциты). Замороженные при минус  $80^{\circ}\text{C}$  образцы клеток размораживали в стакане с водой ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Содержимое пробирки ресуспензировали, переносили в стерильные полипропиленовые пробирки (15 мл), содержащие 10 мл полной инкубационной 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) [24]. После 5 мин центрифугирования ( $4^{\circ}\text{C}$ , 200 g) жидкую фазу отбрасывали для удаления криоконсерванта, клеточный осадок ресуспензировали в 5 мл полной инкубационной среды и использовали для посева, концентрацию клеток определяли в камере Горяева. Культивирование производилось согласно рекомендациям американской коллекции типовых культур (ATCC) [24].

*Инкубация клеток с экстрактами.* В ячейки 96-луночного планшета вносили 100 мкл клеточной суспензии (5 тыс. клеток), инкубировали 24 часа при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5 %  $\text{CO}_2$ . Навеску экстракта из 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 из 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 из лишайников. Время инкубации клеток с экстрактами из лишайников – 48 часов, суммарное время культивирования клеток в планшете – 72 часа. Инкубация проводилась в соответствии с рекомендацией протокола [25].

*Определение метаболической активности* клеток проводили с использованием МТТ-теста на скорость восстановления 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромида (МТТ, M5655, Sigma) [26]. После инкубации клеток с испытуемым экстрактом из 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°C и 5 % CO<sub>2</sub>. Инкубационную среду удаляли, вносили 200 мкл смеси этанол: ДМСО (1:1), содержащее перемешивали до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора формазана измеряли при  $\lambda = 570$  нм с использованием планшетного спектрофотометра TecanSafire II (США), для нормализации данных применяли измерения при  $\lambda = 700$  нм.

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 GraphPadPrismTrial (Version 5.02) и MicrosoftExcel.

**Результаты и их обсуждение.** В качестве критерия цитотоксичности экстрактов из лишайников использовали данные Национального института онкологии США (National cancer institute, NCI), согласно которым сырой экстракт считается активным при  $IC_{50} < 30$  мкг/мл [27], [28]. Установлено, что ацетоновые экстракты из анализируемых видов лишайников токсичны для культуры кератиноцитов человека, за исключением экстракта 3 (таблица 1).

Таблица 1 – Цитотоксический эффект экстрактов из лишайников в отношении клеток линии HaCAT

Номер экстракта	В микрограммах на миллилитр		
	$IC_{10}^*$	$IC_{50}$	$IC_{90}^*$
1	18,6	$19,7 \pm 4,53$	20,8
2	9,2	$20,2 \pm 0,97$	31,6
3	67,4	$71,9 \pm 3,15$	75,6
4	2,3	$11,2 \pm 1,10$	20,4

*Примечание:* \* – значения  $IC_{10}$  и  $IC_{90}$  вычислены по уравнениям аппроксимации динамики влияния концентрации экстрактов из лишайников на жизнеспособность культур клеток.

Диапазон цитотоксического действия экстрактов из лишайников весьма широк ( $IC_{50} = 11$ – $72$  мкг/мл). Наиболее токсичным для культуры клеток кератиноцитов был экстракт 4. Среднетоксичными были экстракты 1 и 2, наименее токсичным оказался экстракт 3. При сравнении полутоксичных доз в МТТ-тесте для известных раздражителей с дозами, полученными для экстрактов из лишайников, можно также сделать некоторые выводы относительно их дерматоксического действия вне модели *in vitro*. Установлена корреляция значений  $IC_{50}$  в цитотоксических тестах на культуре HaCAT и величин оценки эффекта действия вещества на кожу в тесте Дрейза [29]–[33]. Так, доза полуингибирования жизнеспособности кератиноцитов, установленная, например, для известного раздражителя, используемого в косметике – лаурилсульфата (в тесте Дрейза ему присвоен ранг умеренного раздражителя [34]) – составляет  $35 \pm 5$  мкг/мл. Экстракты 1 и 2, обладающие среднетоксичным действием, имели несколько более низкий показатель  $IC_{50}$ . Наименее токсичным оказался экстракт 3 – его полуэффективная доза в два раза выше таковой у модельного вещества. Наиболее токсичным был экстракт 4 – его  $IC_{50}$  в три раза ниже такового у модельного вещества.

По показателю 10-процентного ингибирования жизнеспособности культур клеток можно выделить наибольшую чувствительность кератиноцитов к экстрактам 4 и 2, наименьшую – к экстракту 3.

Зависимости жизнеспособности клеток культуры HaCAT от концентрации экстрактов удовлетворительно описываются S-образными кривыми с коэффициентами аппроксимации около 0,9 (рисунок 1).

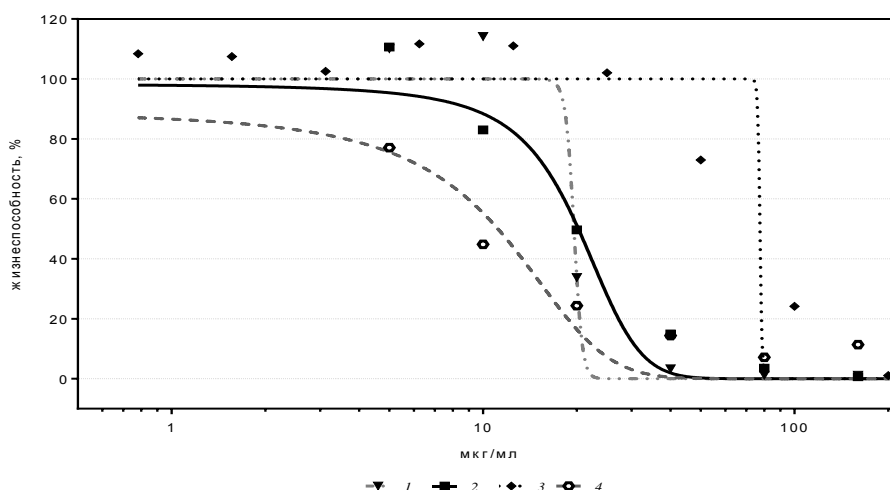


Рисунок 1 – Влияние концентрации экстрактов из лишайников на жизнеспособность клеток кератиноцитов человека

Рост концентрации экстрактов 1 и 3 избирательно влиял на гибель клеток культуры HaCAT. Здесь можно видеть двухфазное действие экстрактов: первая фаза (1-10 мкг/мл) характеризуется умеренной стимуляцией клеток, за ней идет фаза ингибирования роста (10-70 мкг/мл) вплоть до абсолютно летальных доз ( $70 < \text{мкг/мл}$ ). Количественно это выразилось в близких значениях  $IC_{10}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$  для экстрактов 1 и 3. Величины  $IC_{10}$  и  $IC_{90}$  экстракта 1 отличались от величины  $IC_{50}$  на  $5,3 \div 5,9 \%$ ; для экстракта 3 диапазон отличий величин  $IC_{10}$  и  $IC_{90}$  от величины  $IC_{50}$  составил  $4,9 \div 6,7 \%$ . Характер кривых жизнеспособности клеток HaCAT в условиях нарастания концентраций экстрактов 3 и 1 может свидетельствовать о накоплении или появлении при определенной концентрации некоего минорного компонента, вызывающего энергонезависимую гибель клетки (путь онкоза). В популяцию попадают хемотоксичные продукты, вызывающие обширные кластеры клеточной гибели [35].

Можно предположить также наличие у кератиноцитов специфичной мишени по отношению к веществам, выделяющимся из экстракта 4, так как при малых дозах достигается клеточный ответ, постепенно вызывающий полную гибель клеточной популяции. Наличие плавного перехода в кривой для экстрактов 4 и 2 может свидетельствовать о процессах апоптоза, которые происходят в отдельных клетках, причем доля таких клеток возрастает по мере градиентного увеличения концентрации экстракта и, следовательно, действующего агента (-ов).

На рисунке 2 представлены фотографии состояния популяций клеток HaCAT под действием экстрактов 1 и 2. Фотографии выполнены на стадии инкубации с МТТ.

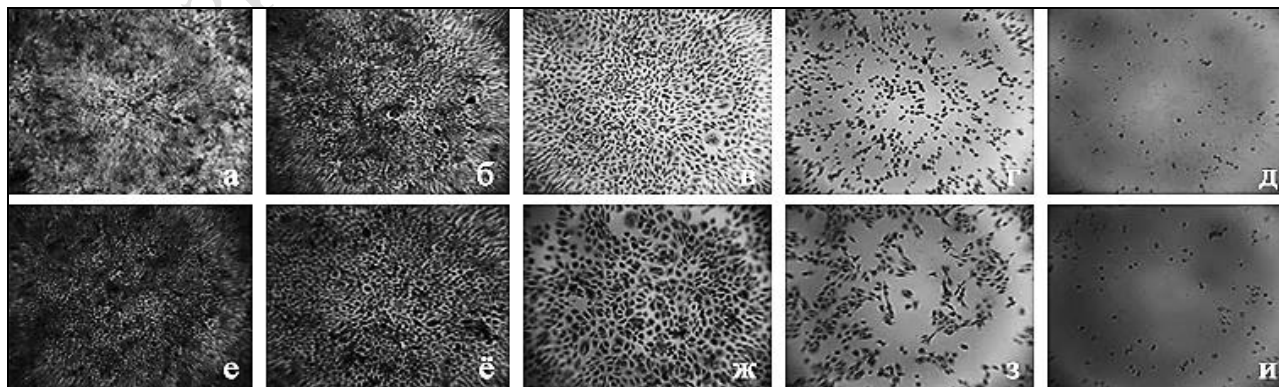


Рисунок 2 – Микрофотографии (кратность увеличения:  $\times 4$ ) изменения состояния популяций клеток HaCAT, при действии экстракта 1 (а-д) и 2 (е-и); буквами обозначены соответственные дозы экстракта в питательной среде (а – контроль; б – 12,5 мкг/мл; в – 25 мкг/мл; г – 50 мкг/мл; д – 200 мкг/мл; е-и – аналогичный градиент концентраций)

Для экстракта 1 при концентрациях 12,5–25 мкг/мл наблюдается снижение плотности монослоя с образованием разбухших клеток (которые, вероятнее всего, претерпевают онкоз). Начиная с 50 мкг/мл (рисунок 2 г) выражен резкий переход (на графике он охарактеризован полным угнетением жизнеспособности клеточной линии), при котором в опытной лунке остаются видны лишь некоторые продукты деструкции клеток, практически исчезающие при концентрации 200 мкг/мл (рисунок 2 д). Схожее действие оказывает и экстракт 2. При концентрациях 12,5–25 мкг/мл так же наблюдается уменьшение монослоя, однако отсутствуют разбухшие клетки, вместо них можно увидеть, вероятно, апоптические клетки в стадии пикноза. При концентрации 50 мкг/мл продолжается уменьшение количества живых клеток и увеличение количества апоптических. При концентрации 200 мкг/мл можно видеть продукты деструкции клеток.

**Заключение.** Исследовали цитотоксическое действие ацетоновых экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. на культуру клеток кератиноцитов человека HaCaT. Установлено, что ацетоновые экстракты из *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* токсичны для культуры клеток кератиноцитов человека. Экстракт из *Ramalina pollinaria* не токсичен для клеток HaCaT. Наиболее чувствительны клетки кератиноцитов человека к экстракту из *Cladonia arbuscula* и *Evernia prunastri*, наименее чувствительны – к экстракту из *Ramalina pollinaria*. Экстракт из *Ramalina pollinaria* может рассматриваться как наиболее перспективный при разработке субстанций для кожного применения у человека.

### 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 / V. Shukla [et al.] // Plant adaptation strategies in changing environment. – 2017. – Ch. 8. – P. 201–234.
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. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential / M. Xu [et al.] // Phytomedicine. – 2016. – Vol. 23, № 5. – P. 441–459.
6. Boustie, J. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites / J. Boustie, M. Grube. – Plant genetic resources. – 2005. – Vol. 3, № 2. – P. 273–287.
7. Shrestha, G. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs / G. Shrestha, L.L.S. Clair. – Phytochemistry reviews. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 229–244.
8. 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. – P. 157–161.
9. The Scandinavian multicenter photopatch study 1980–1985 / P. Thune [et al.] // Photo-dermatology. – 1988. – Т. 5, № 6. – С. 261–269.
10. 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.
11. Salo, H. Lichen picker's dermatitis (*Cladonia alpestris* (L.) Rab.) / H. Salo, M. Hannuksela, B. Hausen. – Contact Dermatitis. – 1981. – Т. 7, № 1. – С. 9–13.
12. Hausen, B.M. An investigation of the allergenic constituents of *Cladonia stellaris* (Opiz) Pous & Vežda ('silver moss', 'reindeer moss' or 'reindeer lichen') / B.M. Hausen, L. Emde, V. Marks. – Contact dermatitis. – 1993. – Т. 28, № 2. – С. 70–76.
13. 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.
14. Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B<sub>4</sub> 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.

15. 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.
16. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines / C. Bézinvin [et al.]. – *Phytomedicine*. – 2003. – Т. 10, № 6–7. – С. 499–503.
17. 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.
18. Proksch, E. The skin: an indispensable barrier / E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen – *Experimental dermatology*. – 2008. – Vol. 17, № 12. – P. 1063–1072.
19. Цуриков, А.Г. Лишайники юго-востока Беларуси (опыт лишеномониторинга) / А.Г. Цуриков. – Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2013. – 276 с.
20. 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.
21. Huneck, S. Identification of lichen substances / S. Huneck, I. Yoshimura. – Berlin : Springer, 1996. – 493 p.
22. The lichens of Great Britain and Ireland: 2nd ed. / Eds. : C.W. Smith [et al.]. – London : British Lichen Society, 2009. – 700 p.
23. Воскресенский, П.И. Техника лабораторных работ / П.И. Воскресенский. – М. : Химия, 1973. – 717 с.
24. American type culture collection [Electronic resource]. – Access mode : <https://www.atcc.org/>. – Access date : 09.01.2018.
25. Cell sensitivity assays: the MTT assay / J van Meerloo [et al.] // *Cancer cell culture: methods and protocols*. – New York : Human Pressa, 2011. – Ch. 20. – P. 237–245.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). A feasible method for in vitro testing of skin irritants / A. Brosin [et al.]. – *Acta dermato-venereologica*. – 1997. – Т. 77, № 1. – С. 26–28.
30. Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays / V. Martinez [et al.]. – *Toxicology letters*. – 2006. – Т. 164, № 3. – С. 259–267.
31. Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability / L. Sanchez [et al.]. – *Toxicology letters*. – 2006. – Т. 161, № 1. – С. 53–60.
32. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay / H.C. Korting [et al.]. – *Journal of dermatological science*. – 1994. – Т. 7, № 2. – С. 119–129.
33. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation / T. Benavides [et al.]. – *Toxicology*. – 2004. – Т. 197, № 3. – С. 229–237.
34. Initial validation of an in vitro test for predicting skin irritancy / P.A. Duffy [et al.]. – *Food and chemical toxicology*. – 1986. – Т. 24, № 6–7. – С. 517–518.
35. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore. – *Toxicologic pathology*. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495–516.
36. Schoop, V.M. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic-coculture with human dermal fibroblasts / V.M. Schoop, N.E. Fusenig, N. Mirancea. – *Journal of investigative dermatology*. – 1999. – Vol. 112, № 3. – P. 343–353.

<sup>1</sup>Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины

<sup>2</sup>Институт радиобиологии  
НАН Беларуси