

УДК 576.6:577.34:661.721:661.727.4:582.29

Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства метанольных и ацетоновых экстрактов пяти видов лишайников

О.М. ХРАМЧЕНКОВА¹, М.В. МАТВЕЕНКОВ²

Оценивали цитотоксические и фотомодифицирующие свойства метанольных и ацетоновых экстрактов лишайников *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina* в отношении культур кератиноцитов человека (НАCaT). Метанольные экстракты лишайников проявляли фотопротекторные свойства; ацетоновые – фотосенсибилизационные и фотопротекторные. Максимальный фотозащитный эффект вызывали метанольные экстракты *R. pollinaria*, *E. prunastri* и *H. physodes* – токсическое действие ультрафиолета снижалось в 1,5–2,6 раза. Ацетоновый экстракт *X. parietina* увеличивал повреждающее действие ультрафиолета в 2–10 раз (фотосенсибилизатор). При наращивании дозы облучения культур кератиноцитов ультрафиолетом метанольные экстракты *R. pollinaria* и *E. prunastri* были фотопротекторами, ацетоновый экстракт *X. parietina* – фотосенсибилизатором.

Ключевые слова: экстракты лишайников, культуры кератиноцитов человека (НАCaT), цитотоксичность, модификация фоточувствительности, доза ультрафиолета, фотопротекция, фотосенсибилизация.

The cytotoxic and photomodifying effects of methanol and acetone extracts of *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, and *Xanthoria parietina* lichens on human keratinocyte cultures (НАCaT) were evaluated. The lichen methanol extracts showed photoprotective properties; acetone – photosensitization and photoprotective. The maximum photoprotective effect was caused by methanol extracts of *R. pollinaria*, *E. prunastri* and *H. physodes* – the toxic effect of ultraviolet radiation decreased by 1,5–2,6 times. The methanol extracts of *R. pollinaria*, *E. prunastri*, and *H. physodes* were photoprotectors – they reduced the toxic effect of ultraviolet radiation and decreased by 1,5–2,6 times. *X. parietina* acetone extract was a photosensitizer – it increased the damaging effect of ultraviolet radiation by 2–10 times. With an increase in the dose of irradiation of keratinocyte cultures with ultraviolet, methanol extracts of *R. pollinaria* and *E. prunastri* were photoprotectors, and acetone extract of *X. parietina* was a photosensitizer. With increasing ultraviolet dose of keratinocytes, the *R. pollinaria* and *E. prunastri* methanol extracts were photoprotectors, and the acetone extract of *X. parietina* was a photosensitizer.

Keywords: lichen extracts, human keratinocyte cultures (НАCaT), cytotoxicity, photosensitivity modification, ultraviolet radiation dose, photoprotection, photosensitization.

Введение. Поиск новых солнцезащитных средств составляет важнейшую часть общей стратегии снижения последствий избыточной инсоляции. В данной сфере достигнут большой прогресс: предложены экранирующие и фильтрующие ультрафиолет соединения неорганической и органической природы (оксиды цинка и титана, октокрилен, авобензон, п-аминобензойная кислота и другие), а также принципиально новые фотодинамические соединения, способные менять свои фотозащитные свойства в зависимости от поглощенной дозы излучения [1].

В настоящее время актуальной является задача коррекции биологических эффектов ультрафиолетового излучения. Перспективными являются биологически активные соединения, способные проявлять эндогенные защитные эффекты [2]: ингибировать воспалительные процессы и активность металлопротеиназ, модулировать системы репарации ДНК/апоптоза, проявлять антиокислительные эффекты и многие другие. К таковым относятся: аналоги меланоцитстимулирующего гормона (MSH-a), инкапсулированный в липосоме фермент фотолиаза, ретиноиды, D-изомеры аминокислот, различные антиоксиданты [2], [3]. Широко изучаются также комплексы веществ и различные экстракты растительного происхождения, показавших способность ингибировать УФ-индуцированные каскадные реакции (апоптоз, воспаление, окислительный стресс) [4], [5].

Экстракты некоторых видов лишайников и их отдельные вторичные метаболиты показали способность эффективно снижать поступающую на кожу дозу ультрафиолета, ослаблять его токсическое действие в моделях клеточных культур [6], [7]. Поэтому широкий скрининг фотозащитных свойств экстрактов лишайников составляет актуальную научную задачу. Поскольку речь идет о коже человека, крайне важна оценка цитотоксичности экстрактов.

Целью настоящего исследования была *in vitro* оценка цитотоксических и фотомодифицирующих свойств метанольных и ацетоновых экстрактов пяти видов лишайников, распространенных на юго-востоке Беларуси.

Методы исследований. *Получение экстрактов лишайников.* Биомассу лишайников *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. отбирали на типичных для каждого вида субстратах, высушивали до воздушно-сухого состояния, измельчали, экстрагировали метанолом и ацетоном в аппарате Сокслета. Растворитель удаляли, экстракты высушивали до порошкообразного состояния, после чего использовали для исследований.

Цитотоксичность экстрактов в отношении клеток человека линии HaCAT, их модифицирующее действие при облучении культур клеток ультрафиолетом выполняли по методикам, описанным в [8], [9].

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

Результаты и их обсуждение. Определяли концентрации экстрактов, на 10 %, 50 % и 90 % снижающих метаболическую активность клеток – IC₁₀, IC₅₀ и IC₉₀, соответственно. Общетоксический потенциал экстрактов оценивали по величине (IC₅₀) [10]; диапазон цитотоксического действия – по IC₁₀ и IC₉₀. Результаты представлены в таблице.

Таблица – Цитотоксичность экстрактов лишайников в отношении клеток линии HaCAT

В микрограммах на миллилитр

Виды лишайников	Виды экстрактов	Показатели цитотоксичности		
		IC ₁₀ *	IC ₅₀	IC ₉₀ *
<i>Cladonia arbuscula</i>	метанольный	15,8	79,3 ± 10,57	> 200
	ацетоновый	< 1,0	11,2 ± 1,11	20,4
<i>Evernia prunastri</i>	метанольный	45,8	116,6 ± 12,22	> 200
	ацетоновый	9,2	20,2 ± 0,93	31,6
<i>Hypogymnia physodes</i>	метанольный	26,2	73,1 ± 5,42	> 200
	ацетоновый	18,6	19,7 ± 4,52	20,8
<i>Ramalina pollinaria</i>	метанольный	60,8	106,3 ± 13,24	188,4
	ацетоновый	36,3	66,9 ± 5,43	132,5
<i>Xanthoria parietina</i>	метанольный	2,3	> 200	> 200
	ацетоновый	62,1	121,5 ± 7,62	> 200

* – значения IC₁₀ и IC₉₀ вычислены по уравнениям аппроксимации зависимости жизнеспособности культур кератиноцитов от концентрации экстрактов лишайников

Ранее была показана цитотоксичность ацетоновых экстрактов лишайников кладонии лесной, эвернии сливовой и гипогимнии вздутой в отношении клеток линии HaCAT [8]. Среди метанольных экстрактов изучаемых видов лишайников цитотоксичных не обнаружено. Ацетоновые экстракты были токсичнее метанольных в 2–8 раз; цитотоксичность ацетоновых и метанольных экстрактов лишайников образует ряд убывания: *C. arbuscula* > *H. physodes* > *E. prunastri* > *R. pollinaria* > *X. parietina*.

По критерию 10-процентного ингибирования культур кератиноцитов можно выделить экстракты лишайников, к которым данные клетки наиболее чувствительны: ацетоновые экстракты *C. arbuscula* и *E. prunastri*, а также метанольный экстракт *X. parietina*.

По критерию IC₉₀ можно утверждать, что наиболее токсичными для культур кератиноцитов человека являются ацетоновые экстракты *C. arbuscula*, *E. prunastri* и *H. physodes*. С помощью уравнений аппроксимации зависимости жизнеспособности клеток от концентрации экстрактов лишайников определили диапазоны их нетоксического действия до 10-процентного

ингибирования жизнеспособности кератиноцитов. Данные диапазоны весьма вариабельны, что указывает на специфичность действия экстрактов лишайников на кератиноциты. Для дальнейших исследований выбрали концентрации экстрактов лишайников, равные 2,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл, нетоксичные в отношении кератиноцитов для большинства экстрактов.

Для оценки модифицирующего действия экстрактов лишайников культуры клеток кератиноцитов облучали градиентом доз ультрафиолетового излучения в присутствии экстрактов выбранных концентраций, после чего на основании аппроксимации кривых «доза-эффект» определяли величину ID_{50} . В качестве контроля использовались аналогичные дозы ультрафиолета для построения кривой без внесения экстрактов в питательную среду. Для определения вклада антиоксидантной активности экстрактов лишайников в их модифицирующее действие использовалось построение аналогичных зависимостей, с предварительным внесением классического модельного антиоксиданта Тролокс. Дизайн эксперимента предполагал оценку модифицирующего действия экстрактов лишайников только за счет их биологических свойств (антиоксидантная активность, активация систем репарации ДНК и др.), но не за счет способности к фотозащите.

Отношение равноэффектных доз ультрафиолета (фактор изменения цитотоксичности, ФИЦ) служило мерой модифицирующего действия экстрактов лишайников при облучении культур кератиноцитов: $ФИЦ = \frac{ID_{50}(\text{опыт})}{ID_{50}(\text{контроль})}$, где ID_{50} (опыт) – величина полулетальной дозы облучения кератиноцитов при добавлении в питательную среду экстрактов лишайников; ID_{50} (контроль) – то же без добавления экстрактов лишайников – рисунок 1.

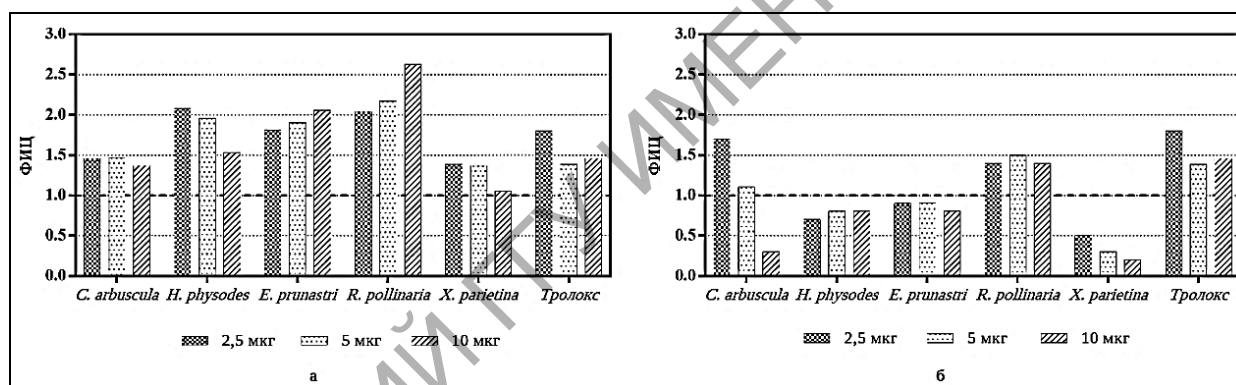


Рисунок 1 – Модификация цитотоксичности ультрафиолета в отношении культур кератиноцитов человека (HaCAT): а – метанольными экстрактами; б – ацетоновыми экстрактами лишайников

Метанольные экстракты изучаемых видов лишайников в основном проявляли фотопротекторные свойства; ацетоновые – фотосенсибилизационные и фотопротекторные. Максимальный фотозащитный эффект проявили метанольные экстракты *R. pollinaria*, *E. prunastri* и *H. physodes* – токсическое действие ультрафиолета снижалось в 1,5–2,6 раза. Можно предположить, что фотопротекторные свойства данных экстрактов (2,5–10,0 мкг/мл) связаны не только с их антиоксидантными свойствами – величины ФИЦ достоверно превышают таковые для Тролокса. Ацетоновый экстракт *X. parietina* можно охарактеризовать как выраженный фотосенсибилизирующий агент, способный увеличивать повреждающее действие ультрафиолета в 2–10 раз. Метанольные экстракты *C. arbuscula* и *X. parietina*, а также ацетоновый экстракт *R. pollinaria* оказывали умеренное фотозащитное действие; ацетоновые экстракты *E. prunastri* и *H. physodes* – умеренное фотосенсибилизирующее действие. Фотопротекторное действие экстрактов лишайников: повышалась с увеличением концентрации (метанольные экстракты *E. prunastri* и *R. pollinaria*); понижалось с увеличением концентрации (метанольные экстракты *H. physodes* и *X. parietina*; ацетоновый экстракт *C. arbuscula*); практически не зависело от концентрации (метанольный экстракт *C. arbuscula* и ацетоновый экстракт *R. pollinaria*). Фотосенсибилизирующее действие ацетонового экстракта *X. parietina* усиливалось с повышением его концентрации в среде инкубирования кератиноцитов.

Модифицирующее действие экстрактов лишайников, внесенных в среду инкубирования кератиноцитов в концентрациях 2,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл, на повреждающее действие ультрафиолета проявлялось при наращивании дозы облучения клеточных культур – рисунок 2.

При облучении культур кератиноцитов, инкубированных в присутствии 2,5 мкг/мл метанольных экстрактов лишайников, в диапазоне доз 1–5 мДж/см² отмечено протекторное действие для экстрактов *H. physodes*, *E. prunastri*, *R. pollinaria* и *X. parietina*, тогда как экстракт *C. arbuscula* показал умеренное фотосенсибилизирующее действие в диапазоне 1–3 мДж/см². Присутствие 2,5 мкг/мл ацетоновых экстрактов в среде инкубирования кератиноцитов приводило к снижению их жизнеспособности экстрактами *E. prunastri*, *H. physodes* и *X. parietina* по всему диапазону облучения. Экстракты *C. arbuscula* и *R. pollinaria* повышали устойчивость кератиноцитов преимущественно в области высоких доз 2–10 мДж/см².

Увеличение концентрации экстрактов лишайников в среде культивирования кератиноцитов до 5,0 мкг/мл позволило выявить усиление защитного действия метанольных и ацетоновых экстрактов *R. pollinaria*, а также снижение этого эффекта для метанольного экстракта *H. physodes* и ацетонового *C. arbuscula*. Увеличение защитного действия экстрактов *R. pollinaria* проявлялось в виде повышения жизнеспособности кератиноцитов в области высоких доз ультрафиолета (3–10 мДж/см²). Снижение защитного действия экстрактов *H. physodes* и *C. arbuscula* выглядело как уменьшение жизнеспособности кератиноцитов в области низких доз 1–3 мДж/см². Повышение концентрации ацетонового экстракта *X. parietina* до 5,0 мкг/мл усилило его фотосенсибилизирующее действие по всему диапазону облучения клеток.

Дальнейшее увеличение концентрации экстрактов в питательной среде до 10 мкг/мл также изменило характер модификации токсического действия ультрафиолета. Фотозащитные свойства метанольных экстрактов *R. pollinaria* и *E. prunastri* усилились в виде увеличения жизнеспособности кератиноцитов в области доз 3–10 мДж/см².

В случае с аналогичными экстрактами *H. physodes* и *X. parietina* жизнеспособность клеток понижалась в области доз 1–3 мДж/см². Ацетоновый экстракт *C. arbuscula* проявлял выраженное фотосенсибилизирующее действие в области доз 1–3 мДж/см², сохраняя фотозащитность в области высоких доз 4–10 мДж/см². Повышение концентрации ацетонового экстракта *X. parietina* до 10,0 мкг/мл еще больше усилило его фотосенсибилизирующее действие по всему диапазону облучения клеток.

Зависимости «доза-эффект» при внесении в инкубационную среду метанольных экстрактов из *Hypogimnia physodes* и *Xanthoria parietina*, а также ацетонового из *Ramalina pollinaria* – практически совпадают с таковой при введении Тролокса. Это позволяет предположить наличие антиоксидантного механизма в фотопротекторном действии данных экстрактов.

Таким образом, характер модификации экстрактами лишайников действия ультрафиолета на культуры кератиноцитов человека зависит как от концентрации экстрактов, так и от дозы облучения.

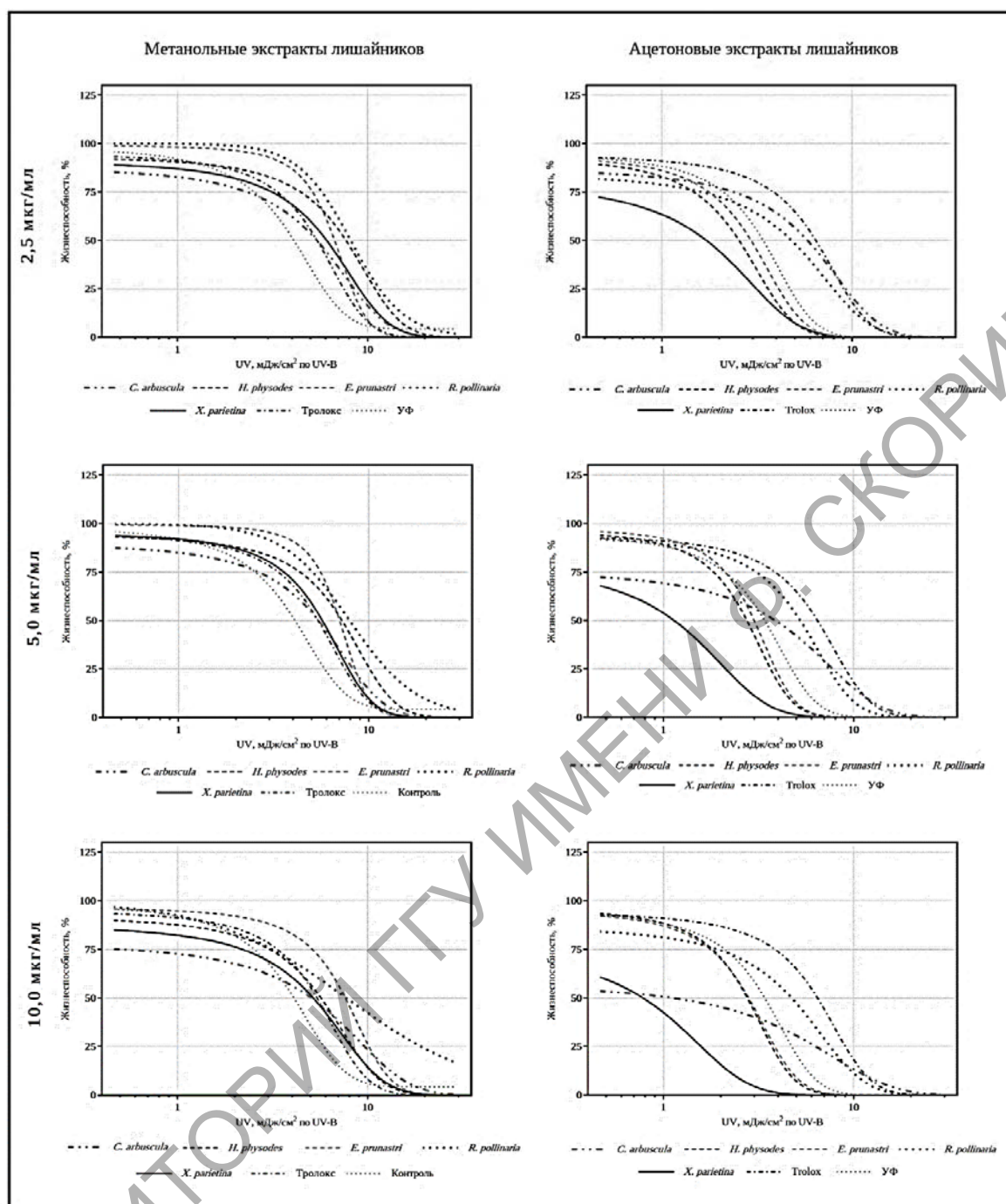


Рисунок 2 – Влияние доз ультрафиолета и экстрактов лишайников на жизнеспособность кератиноцитов человека (HaCAT)

Способ получения экстрактов лишайников может влиять на состав извлекаемых вторичных метаболитов, или на их долевое соотношение в субстанции. Влияние состава извлеченных из лишайника вторичных метаболитов, по-видимому, проявлялось в экспериментах с экстрактами *Ramalina pollinaria*: метанольный экстракт при концентрациях 2,5–5 мкг/мл проявлял защитные свойства в области низких доз УФ, чего не было отмечено у ацетоновых экстрактов. В данном свете также примечательно действие экстрактов из *Xanthoria parietina*, *Hypogimnia physodes* и *Evernia prunastri*, наборы вторичных метаболитов которых, извлеченные метанолом, оказались фотозащитными, а извлеченные ацетоном – фотосенсибилизирующими.

Действие других экстрактов не зависело от концентрации, но проявлялось количественно в тех или иных областях доз ультрафиолета. Это позволяет предположить наличие в экстрактах веществ, либо одинаковых по химической структуре, либо сходных по биологи-

ческому действию. В свою очередь количественные различия в модификации могут быть обусловлены различным долевым содержанием ключевых биологически активных веществ как в экстрактах, так и в различных градиентах их концентрации.

Зависимость характера модификации от дозы излучения позволила выявить экстракты, обладающие способностью изменять воздействие УФ в области высоких доз (метанольные экстракты *H. physodes* и *X. parietina* и ацетоновый *R. pollinaria*), а также изменяющие воздействие излучения на клетки на протяжении всего диапазона доз (ацетоновые экстракты *H. physodes*, *E. prunastri* и *X. parietina*). Отдельного упоминания заслуживают метанольные экстракты *R. pollinaria* и *E. prunastri*, способные в зависимости от концентрации менять действие малых и больших доз УФ, а также экстракты *C. arbuscula*, снижающие жизнеспособность кератиноцитов в области малых доз и увеличивающие в области больших. Ранее нами были описаны похожие эффекты этанольных экстрактов *R. pollinaria* и *C. arbuscula* [9].

Данные особенности, по-видимому, обусловлены различной биологической активностью экстрактов лишайников. Наиболее очевидным механизмом модификации действия ультрафиолета является снижение или увеличение образования токсических продуктов фотореакций, главным образом, свободных радикалов. Существуют данные об антиоксидантных свойствах экстрактов и отдельных вторичных метаболитов *H. physodes* [11]. Реализация фототоксического действия ацетонового экстракта этого же вида, а также аналогичных экстрактов *R. pollinaria* и *X. parietina* остается открытым вопросом. Необычные модифицирующие свойства экстрактов *C. arbuscula* могут быть объяснены наличием в них цитостатических веществ, снижающих пролиферативную активность клеточной популяции, тем самым делающих их более нечувствительными к воздействию проапоптических стимулов ультрафиолета.

Наиболее интересным представляется действие метанольных экстрактов *R. pollinaria* и *E. prunastri* в диапазоне концентраций 2,5–5,0 мкг/мл. До определенного предела клетки как бы «индифферентны» к воздействию ультрафиолета, причем их общий пролиферативный потенциал остается на уровне интактных клеток. Можно предположить наличие в этом случае иного, не цитостатического эффекта, обусловленного полной инактивацией некоторых механизмов токсического воздействия ультрафиолета. Это могут быть противовоспалительные и антиапоптотические эффекты (усиление репарации, снижение экспрессии проапоптотических генов и др.), а также инактивация внутриклеточных фотосенсибилизаторов.

Заключение. In vitro оценивали цитотоксическое действие метанольных и ацетоновых экстрактов лишайников *C. arbuscula*, *H. physodes*, *E. prunastri*, *R. pollinaria* и *X. parietina* на культуры кератиноцитов человека (НАСаТ). Среди метанольных экстрактов изучаемых видов лишайников цитотоксичных не обнаружено. Ацетоновые экстракты лишайников токсичнее метанольных в 2–8 раз. Метанольные экстракты изучаемых видов лишайников в основном проявляли фотопротекторные свойства; ацетоновые – фотосенсибилизационные и фотопротекторные. Максимальный фотозащитный эффект проявили метанольные экстракты *R. pollinaria*, *E. prunastri* и *H. physodes* – токсическое действие ультрафиолета снижалось в 1,5–2,6 раза. Ацетоновый экстракт *X. parietina* является фотосенсибилизатором, увеличивающим повреждающее действие ультрафиолета в 2–10 раз. При наращивании дозы облучения культур кератиноцитов ультрафиолетом характер модификации экстрактами лишайников действия излучения на клетки зависел как от концентрации экстрактов, так и от дозы облучения и проявлялся в виде фотопротекции (метанольные экстракты *R. pollinaria* и *E. prunastri*) и фотосенсибилизации (ацетоновый экстракт *X. parietina*).

Литература

1. Dose-dependent Progressive Sunscreens. A New Strategy for Photoprotection? / A. Gallardo [et al.] // Photochem Photobiol Sci. – 2010. – Iss. 9 (4). – P. 530–534.
2. New strategies of photoprotection / L. Verschooten [et al.] // Photochemistry and Photobiology. – 2006. – Vol. 82 (4). – P. 1016–1023.
3. Yeager, D. G. What's New in Photoprotection: A Review of New Concepts and Controversies / D. G. Yeager, H. W. Lim // Dermatologic clinics. – 2019. – Vol. 37(2). – P. 149–157.

4. Takshak, S. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress / S. Takshak, S. B. Agrawal // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2019. – Vol. 193. – P. 51–88.
5. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review / M. Radice [et al.] // *Fitoterapia*. – 2016. – Vol. 114. – P. 144–162.
6. Photoprotective capacities of lichen metabolites: a joint theoretical and experimental study / M. Millot [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2012. – Vol. 111(8). – P. 17–26.
7. 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.
8. Храмченкова, О. М. Цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов из лишайников в отношении линии кератиноцитов человека HaCAT / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеенков // *Известия Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины*. – 2018. – № 3 (108). – С. 81–86.
9. Храмченкова, О. М. Фотозащитная активность экстрактов из пяти видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеенков // *Журнал Бел. гос. ун-та. Экология*. – 2018. – № 4. – С. 52–62.
10. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer / A. Itharat [et al.] // *Journal of ethnopharmacology*. – 2004. – Vol. 90(1). – P. 33–38.
11. 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.

¹Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины

²Институт радиобиологии
НАН Беларуси

Поступила в редакцию 10.09.2020