

## Хлороформные и этилацетатные экстракты пяти видов лишайников: фотозащитные, цитотоксические и фотомодифицирующие свойства

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

*In vitro* оценивали фотозащитные, цитотоксические и фотомодифицирующие свойства хлороформных и этилацетатных экстрактов из распространенных в Беларуси лишайников *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina* в отношении культуры кератиноцитов человека (HaCAT). Установлено, что данные экстракты не являются фотозащитными, обладают фотомодифицирующим действием при облучении культур кератиноцитов ультрафиолетом. Цитотоксичными для культур кератиноцитов человека линии HaCAT были хлороформные экстракты *C. arbuscula*, *H. physodes* и *X. parietina*; этилацетатные – *C. arbuscula*. Хлороформный и этилацетатный экстракты *R. pollinaria* (2,5 ÷ 5,0 мкг/мл) проявляли слабые фотопротекторные свойства. Хлороформные экстракты *E. prunastri* и *H. physodes* (2,5 мкг/мл) и этилацетатные экстракты *E. prunastri* (2,5 мкг/мл), *H. physodes* (2,5 ÷ 5,0 мкг/мл), *R. pollinaria* (10 мкг/мл) фотомодифицирующих свойств не проявляли. Все остальные растворы экстрактов проявляли фотосенсибилизирующие свойства, причем экстракты *C. arbuscula* и *X. parietina* усиливали поражающее действие ультрафиолета в 4 ÷ 95 раз. При наращивании доз облучения культур кератиноцитов ультрафиолетом от нулевых до летальных значений с ростом концентраций экстрактов лишайников в питательной среде повышалась их фотосенсибилизирующая активность. **Ключевые слова:** экстракты лишайников, солнцезащитный фактор (SPF), критическая длина волны ( $\lambda_{\text{крит}}$ ), отношение УФ-А/УФ-Б, культуры кератиноцитов (HaCAT), ультрафиолет, полуингибирующая доза ( $ID_{50}$ ), фотопротекторы, фотосенсибилизаторы.

*In vitro*, the photoprotective, cytotoxic and photomodifying properties of chloroform and ethyl acetate extracts from the widely distributed in Belarus lichens *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* and *Xanthoria parietina* in the culture of human keratinocytes (HaCAT), are estimated. It was found that these extracts are not photoprotective, they have a photomodifying effect upon irradiation of keratinocyte cultures with ultraviolet light. Chloroform extracts of *C. arbuscula*, *H. physodes*, and *X. parietina* were cytotoxic for human keratinocyte cultures of the HaCAT line; ethyl acetate – *C. arbuscula*. Chloroform and ethyl acetate extracts of *R. pollinaria* (2,5 ÷ 5,0 µg/ml) showed weak photoprotective properties. Chloroform extracts of *E. prunastri* and *H. physodes* (2,5 µg/ml) and ethyl acetate extracts of *E. prunastri* (2,5 µg/ml), *H. physodes* (2.5 ÷ 5.0 µg/ml), *R. pollinaria* (10 µg/ml) did not show photomodifying properties. All other solutions of extracts exhibited photosensitizing properties, and extracts of *C. arbuscula* and *X. parietina* increased the damaging effect of ultraviolet radiation by 4 ÷ 95 times. With increasing doses of ultraviolet irradiation of keratinocyte cultures from zero to lethal values, with an increase in the concentration of lichen extracts in the nutrient medium, their photosensitizing activity increased.

**Keywords:** lichen extracts, sunscreen factor (SPF), critical wavelength ( $\lambda_{\text{crit}}$ ), UV-A/UV-B ratio, keratinocyte culture (HaCAT), ultraviolet, semi-inhibitory dose ( $ID_{50}$ ), photoprotectors, photosensitizers.

**Введение.** Фотозащитные и цитотоксические свойства экстрактов лишайников изучают последние несколько десятилетий. Для некоторых экстрактов показана довольно высокая степень фотозащиты, отсутствие токсичности для клеточных культур [1]–[3]. Вместе с тем, обнаружено фотосенсибилизирующее действие экстрактов лишайников в отношении культур кератиноцитов [4], [5]. Поэтому широкий скрининг фотозащитных, цитотоксических и фотомодифицирующих свойств экстрактов лишайников составляет актуальную научную задачу. Для получения экстрактов хлороформ используют очень часто, этилацетат – очень редко [6]–[9].

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

**Методы исследований.** 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 в пригородных лесах, высушивали, измельчали, экстрагировали хлороформом и этилацетатом в аппарате Сокслета. Растворитель удаляли, экстракты высушивали, после чего использовали для исследований.

Растворы сухих экстрактов лишайников в этаноле использовали для фотометрии по методике, описанной в [4], [10]. Средство измерения – УФ-спектрофотометр Solar PB 2201, измерительные кюветы – кварцевые. По результатам фотометрии рассчитывали величины SPF,  $\lambda_{\text{крит}}$  и соотношения УФ-А/УФ-Б – основных показателей фотозащитности экстрактов лишайников [4], [10].

Эпителиальные клетки человека линии HaCAT (кератиноциты), полученные в НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета, культивировали согласно рекомендациям американской коллекции типовых культур (АТСС) [11]. Определение цитотоксичности экстрактов лишайников в отношении кератиноцитов, расчеты величины фактора изменения цитотоксичности (ФИЦ), оценку влияния дозы ультрафиолета и экстрактов лишайников на жизнеспособность клеточных культур изучали по методике, изложенной в [4], [10].

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

**Результаты и их обсуждение.** При экстрагировании биомассы хлороформом и этилацетатом не только выход экстрактов, но и их фотозащитные свойства для определенного вида лишайников оказались очень близкими – таблица 1.

Таблица 1 – Фотозащитные свойства экстрактов лишайников

| Вид лишайников       | Экстрагент | Выход экстракта, % | SPF         | $\lambda_{\text{крит}}$ , нм | УФ-А/УФ-Б    |
|----------------------|------------|--------------------|-------------|------------------------------|--------------|
| <i>C. arbuscula</i>  | хлороформ  | 3,1 ± 0,47         | 7,2 ± 0,74  | 368 ± 4,39                   | 0,93 ± 0,094 |
|                      | этилацетат | 3,2 ± 0,53         | 9,4 ± 0,97  | 372 ± 5,01                   | 1,02 ± 0,081 |
| <i>E. prunastri</i>  | хлороформ  | 9,8 ± 1,49         | 39,6 ± 2,05 | 344 ± 5,25                   | 0,34 ± 0,054 |
|                      | этилацетат | 8,9 ± 1,18         | 40,4 ± 2,18 | 351 ± 5,39                   | 0,39 ± 0,058 |
| <i>H. physodes</i>   | хлороформ  | 10,8 ± 1,34        | 21,9 ± 1,84 | 346 ± 3,49                   | 0,65 ± 0,073 |
|                      | этилацетат | 12,6 ± 1,22        | 22,4 ± 1,82 | 347 ± 7,86                   | 0,63 ± 0,069 |
| <i>R. pollinaria</i> | хлороформ  | 7,4 ± 0,87         | 39,9 ± 2,11 | 330 ± 9,21                   | 0,24 ± 0,044 |
|                      | этилацетат | 10,2 ± 1,22        | 39,5 ± 1,83 | 328 ± 8,49                   | 0,21 ± 0,039 |
| <i>X. parietina</i>  | хлороформ  | 3,9 ± 0,37         | 4,6 ± 0,87  | 385 ± 7,18                   | 1,11 ± 0,086 |
|                      | этилацетат | 3,3 ± 0,66         | 4,5 ± 0,76  | 376 ± 6,94                   | 0,86 ± 0,074 |

Из биомассы *C. arbuscula* и *X. parietina* при помощи хлороформа и этилацетата извлекается 3–4 % экстрактивных веществ, тогда как из *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria* – около десяти процентов. Среди хлороформных и этилацетатных экстрактов лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* фотозащитных не обнаружено. Ни один из них не имеет одновременно таких фотозащитных свойств, как SPF ≥ 15,0 и  $\lambda_{\text{крит}} \geq 373,0$  [12]. Следует отметить, что экстракты *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria* весьма эффективны в области УФ-Б (290 ÷ 320 нм), будучи при этом малоактивными в области УФ-А (320 ÷ 400 нм).

Цитотоксические свойства хлороформных и этилацетатных экстрактов лишайников существенно отличались и не были схожими для одного вида лишайников – таблица 2.

Таблица 2 – Цитотоксический эффект экстрактов лишайников в отношении культуры кератиноцитов человека (HaCAT), оцененный с помощью МТТ-теста после 48 часов инкубации

| Вид лишайника        | Экстрагент | В микрограммах на миллилитр |                  |                    |
|----------------------|------------|-----------------------------|------------------|--------------------|
|                      |            | IC <sub>10</sub> *          | IC <sub>50</sub> | IC <sub>90</sub> * |
| <i>C. arbuscula</i>  | хлороформ  | 4,9                         | 20,7 ± 1,76      | 71,2               |
|                      | этилацетат | 16,4                        | 32,6 ± 2,15      | 59,6               |
| <i>E. prunastri</i>  | хлороформ  | 22,1                        | 52,8 ± 4,87      | >200               |
|                      | этилацетат | 41,1                        | 69,0 ± 8,19      | >200               |
| <i>H. physodes</i>   | хлороформ  | 12,9                        | 27,7 ± 2,43      | 59,3               |
|                      | этилацетат | 14,6                        | 34,0 ± 2,11      | 80,4               |
| <i>R. pollinaria</i> | хлороформ  | 20,4                        | 52,9 ± 6,93      | >200               |
|                      | этилацетат | 38,2                        | 76,4 ± 4,70      | 172                |
| <i>X. parietina</i>  | хлороформ  | 3,7                         | 28,3 ± 5,33      | >200               |
|                      | этилацетат | 9,7                         | 41,7 ± 6,20      | >200               |

Примечание: \* – значения IC<sub>10</sub> и IC<sub>90</sub> вычислены по уравнениям аппроксимации кривых влияния концентрации экстрактов лишайников на жизнеспособность культур клеток.

Нетоксичными для культур кератиноцитов были экстракты хлороформные экстракты *E. prunastri* и *R. pollinaria*; этилацетатные экстракты *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina*. Хлороформные экстракты *H. physodes* и *X. parietina*, а также этилацетатный экстракт *C. arbuscula* были «условно» цитотоксичными – значения  $IC_{50}$  были близки к нормативному значению – 30 мкг/мл [13]. По критерию цитотоксичности для кератиноцитов анализируемые экстракты лишайников могут быть также разделены на две группы: сублетальные концентрации сопоставимы с полумлетальными; сублетальные концентрации в 4 ÷ 10 раз выше полумлетальных.

Для оценки фотомодифицирующих возможностей экстрактов лишайников устанавливали субтоксичные, полумтоксичные и токсичные дозы ультрафиолета в отношении культуры кератиноцитов HaCAT. В качестве модификаторов эффектов ультрафиолета в отношении клеточных культур использовали хлороформные и этилацетатные экстракты лишайников в концентрациях 2,5; 5,0 и 10 мкг/мл. Определяли величины полуингибирующих доз ультрафиолета в опыте (в присутствии растворов экстрактов лишайников) и в контроле (без экстрактов лишайников в питательной среде). Отношение равноэффектных доз ультрафиолета в опыте и контроле представляет собой фактор изменений цитотоксичности (ФИЦ). При  $ФИЦ > 1$  экстракт лишайника (модификатор фоточувствительности) является фотопротектором, при  $ФИЦ < 1$  – фотосенсибилизатором. Для оценки возможного вклада антиоксидантных механизмов действия экстрактов лишайников на цитотоксичность ультрафиолета применяли Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) – широко применяемый в подобного рода исследований модельный антиоксидант, который вносили в питательную среду в количестве 2,5; 5,0 и 10 мкг/мл вместо экстракта лишайника. Результаты приведены на рисунке 1.

Установлено, что хлороформные и этилацетатные экстракты *C. arbuscula* и *X. parietina* являются сильно выраженными фотосенсибилизаторами, усиливающими поражающее действие ультрафиолета 4 ÷ 95 раз, или полностью подавляющими жизнеспособность кератиноцитов при облучении их самыми малыми дозами излучения (этилацетатный экстракт *C. arbuscula*, 5,0 ÷ 10 мкг/мл). Хлороформные экстракты *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria*; а также этилацетатные экстракты *E. prunastri* и *H. physodes* в концентрации 10 мкг/мл также проявляли фотосенсибилизирующую активность – усиливали поражение кератиноцитов ультрафиолетом в облучения в 3,2 ÷ 6,3 раза.

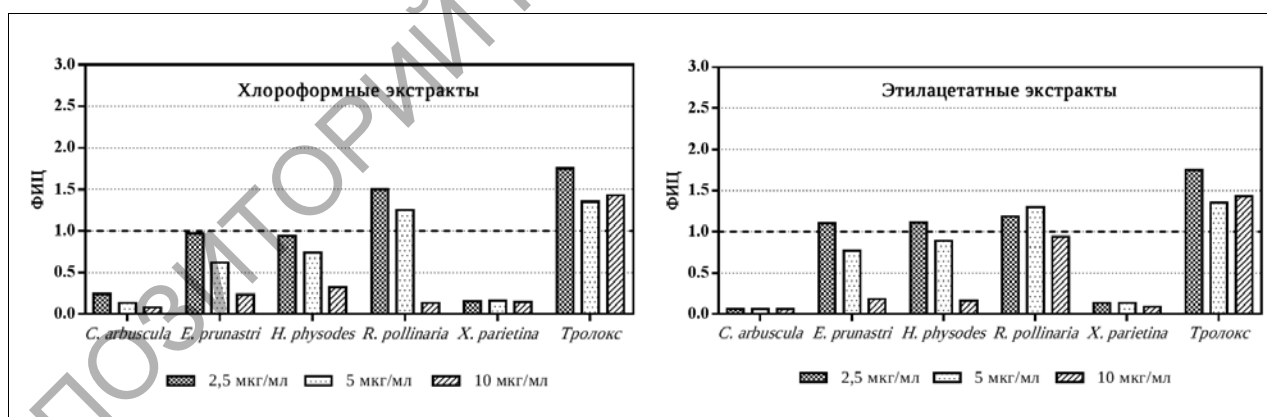


Рисунок 1 – Модификация цитотоксичности ультрафиолета в отношении культур кератиноцитов человека (HaCAT): а – хлороформными экстрактами; б – этилацетатными экстрактами лишайников

Хлороформные экстракты *E. prunastri* и *H. physodes* (2,5 мкг/мл) и этилацетатные экстракты *E. prunastri* (2,5 мкг/мл), *H. physodes* (2,5 ÷ 5,0 мкг/мл), *R. pollinaria* (10 мкг/мл) фотомодифицирующих свойств не проявляли.

Слабые фотопротекторные свойства проявляли хлороформный и этилацетатный экстракты *R. pollinaria* (2,5 ÷ 5,0 мкг/мл), ослаблявшие поражающее действие ультрафиолета до 1,5 раз.

Таким образом, выраженность фотомодифицирующего действия экстрактов лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* зависит от их концентрации в среде культивирования кератиноцитов человека линии HaCAT.

При наращивании доз облучения культур кератиноцитов ультрафиолетом от нулевых до летальных значений фотомодифицирующие свойства хлороформных и этилацетатных экстрактов лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* проявлялись схожим образом (рисунок 2).

Показавший фотопротекторный эффект, хлороформный экстракт *R. pollinaria* в концентрации 2,5 мкг/мл умеренно снижал жизнеспособность клеток в области низких доз (1–3 мДж/см<sup>2</sup>) и повышал в области высоких (4–20 мДж/см<sup>2</sup>). Данная область фотопротекции почти совпадает с таковой у модельного антиоксиданта – Тролокса. Аналогичная тенденция в модификации эффектов облучения наблюдалась для этилацетатного экстракта того же вида, а также для экстрактов *H. physodes* и *E. prunastri*. Однако количественно в их действии проявлялось более выраженное фотосенсибилизирующее действие в области малых доз ультрафиолета и более слабая фотозащита в области высоких доз. Экстракты *C. arbuscula* и *X. parietina*, значительно усиливавшие фоточувствительность клеточных культур на протяжении градиента доз, вплоть до 6 мДж/см<sup>2</sup>, проявляли некоторые фотопротекторные свойства при более высоких дозах.

Увеличение концентрации экстрактов до 5 мкг/мл усиливало фотосенсибилизационную активность экстрактов лишайников в области малых доз ультрафиолета. При этом сохранялись некоторые фотопротекторные свойства экстрактов лишайников в области высоких доз облучения. Все это справедливо для случаев сравнения опытных серий культур кератиноцитов с контролем, но не для сравнения с сериями, где использовался Тролокс. Фотозащитные характеристики экстрактов лишайников всегда были «хуже», чем у Тролокса, что позволяет предположить наличие иного, не антиоксидантного механизма «противостояния» клеточных культур последствиям их облучения высокими дозами ультрафиолета. Экстракты *C. arbuscula* и *X. parietina* были наиболее мощными фотосенсибилизаторами.

При внесении в питательную среду кератиноцитов экстрактов лишайников в концентрации 10 мкг/мл наблюдались выраженные эффекты усиления токсического действия ультрафиолета для всех экстрактов, кроме этилацетатного *R. pollinaria*. Жизнеспособность кератиноцитов снижалась до значений 60 % и меньше при облучении их самыми низкими экспериментальными дозами (0,46 мДж/см<sup>2</sup>), причем данный эффект усиливался на протяжении всего градиента доз. Фотосенсибилизирующая активность экстрактов *X. parietina* практически сравнивалась с таковой для *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria*. Экстракты *C. arbuscula* были губительными для кератиноцитов.

Таким образом характер модификации хлороформными и этилацетатными экстрактами лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* повреждающего действия ультрафиолета в отношении культур кератиноцитов человека линии HaCAT зависит как от концентрации экстрактов в питательной среде, так и от величин доз ультрафиолетового излучения. По мере увеличения концентрации экстрактов баланс эффектов протекция/сенсibilизация смещается в сторону усиления токсического действия ультрафиолета. С ростом дозы ультрафиолета влияние хлороформных и этилацетатных экстрактов лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* наиболее заметно в области высоких доз (> 6 мДж/см<sup>2</sup>).

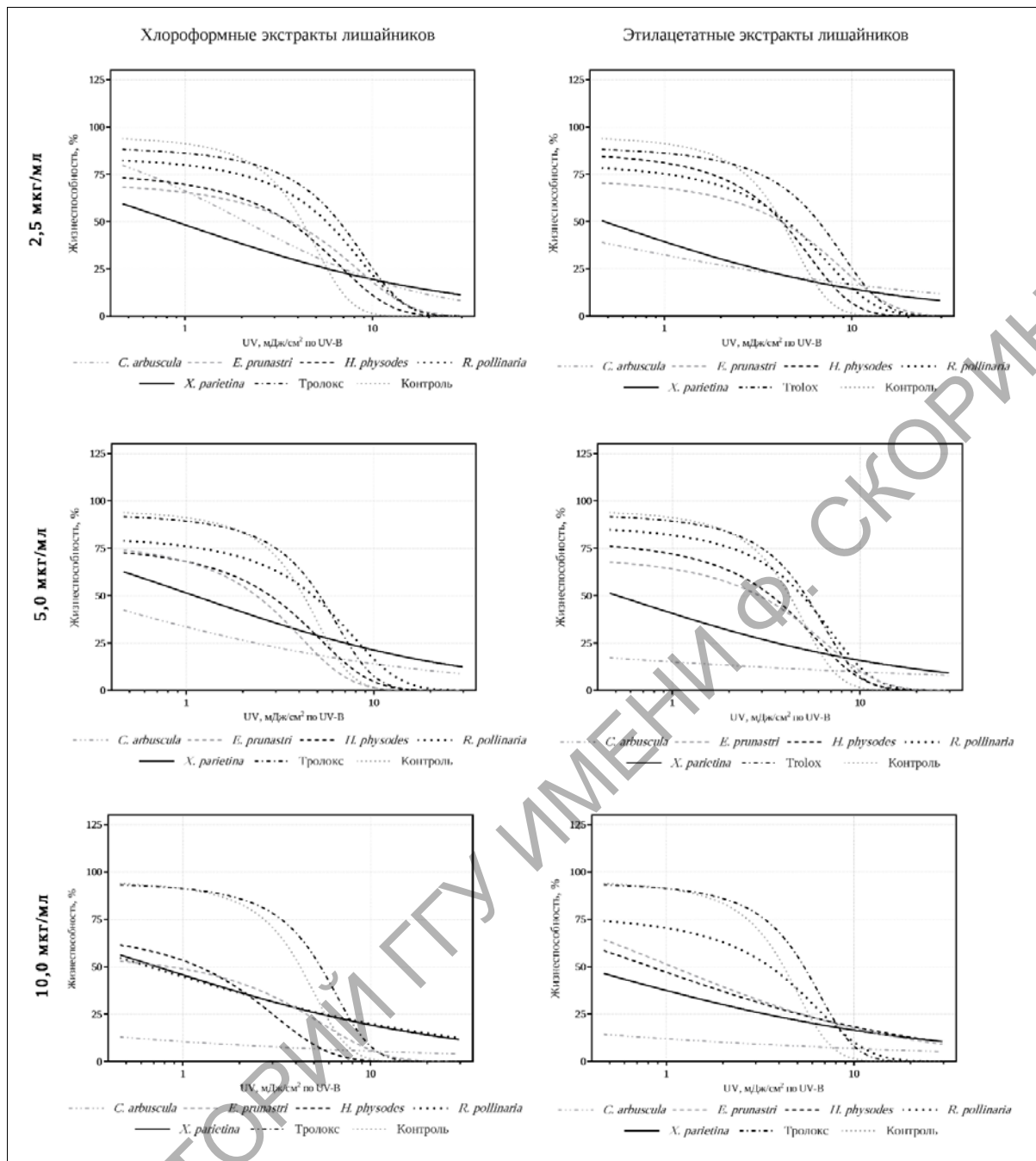


Рисунок 2 – Влияние доз ультрафиолета и экстрактов лишайников на жизнеспособность кератиноцитов человека (HaCAT)

**Заключение.** Выход хлороформных и этилацетатных из воздушно-сухой биомассы лишайников *C. arbuscula* и *X. parietina* составляет 3-4 %; из *E. prunastri*, *H. physodes* и *R. pollinaria* – около 10 %. Хлороформные и этилацетатные экстракты лишайников *C. arbuscula*, *E. prunastri*, *H. physodes*, *R. pollinaria* и *X. parietina* не являются фотозащитными по показателям величин SPF и  $\lambda_{\text{крит}}$ .

Цитотоксичными для культур кератиноцитов человека линии HaCAT были хлороформные экстракты *C. arbuscula*, *H. physodes* и *X. parietina*; этилацетатные – *C. arbuscula*.

Хлороформный и этилацетатный экстракты *R. pollinaria* (2,5 ÷ 5,0 мкг/мл) проявляли слабые фотопротекторные свойства (ФИЦ = 1,3 ÷ 1,5). Хлороформные экстракты *E. prunastri* и *H. physodes* (2,5 мкг/мл) и этилацетатные экстракты *E. prunastri* (2,5 мкг/мл), *H. physodes* (2,5 ÷ 5,0 мкг/мл), *R. pollinaria* (10 мкг/мл) фотомодифицирующих свойств не проявляли. Все остальные растворы экстрактов проявляли фотосенсибилизирующие свойства, причем экстракты *C. arbuscula* и *X. parietina* усиливали поражающее действие ультрафиолета в 4 ÷ 95 раз.

При наращивании доз облучения культур кератиноцитов ультрафиолетом от нулевых до летальных значений с ростом концентраций экстрактов лишайников в питательной среде повышалась их фотосенсибилизирующая активность в области доз до  $3 \div 6$  мДж/см<sup>2</sup>.

### Литература

1. Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. in vitro / H. Zeytinoglu [et al.] // *Phytother Res.* – 2008. – Vol. 22. – P. 118–123.
2. 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.
3. 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.
4. Храменкова, О. М. Фотозащитная активность экстрактов из пяти видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков. – Журн. Бел. гос. ун-та. Экология. – 2018. – № 4. – С. 52–62.
5. Храменкова, О. М. Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства метанольных и ацетоновых экстрактов пяти видов лишайников / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // *Известия Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины.* – 2020. – № 6 (123). – С. 92–98.
6. Manojlovic, N. T. Antimicrobial activity of extracts and various fractions of chloroform extract from the lichen *Laurera benguelensis* / N. T. Manojlovic, P. J. Vasiljevic, Z. S. Marković // *Journal of Biological Research-Thessaloniki.* – 2010. – Vol. 13. – P. 27–34.
7. Screening of antimicrobial activity and cytotoxic effects of two *Cladonia* species / B. Açikgöz [et al.] // *Z Naturforsch.* – 2013. – Vol. 68 c. – P. 191–197.
8. The isolation, analytical characterization by HPLC–UV and NMR spectroscopy, cytotoxic and antioxidant activities of baecomycetic acid from *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis* / N. T. Manojlović [et al.] // *Hem. ind.* – 2011. – Vol. 65 (5). – P. 591–598.
9. *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents / T. Mitrović [et al.] // *EXCLI Journal.* – 2014. – Vol. 13. – P. 938–953.
10. Храменкова, О. М. Цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов из лишайников в отношении линии кератиноцитов человека HaCAT / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // *Известия Гомельского гос. ун-та им. Ф. Скорины.* – 2018. – № 3 (108). – С. 81–86.
11. American Type Culture Collection [Electronic resource]. – Access mode : <https://www.atcc.org>. – Access date: 18.08.2018.
12. Rojas, J. L. Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes / J. L. Rojas, M. Díaz-Santos, N. A. Valencia-Islas // *UK J Pharm Biosci.* – 2015. – Vol. 3. – P. 18–26.
13. 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.

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

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

Поступила в редакцию 19.01.2021