

УДК 582.29:630*113.2:615.277.3(476.2)

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ ЛИШАЙНИКОВ В ОТНОШЕНИИ КУЛЬТУР ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

О. М. ХРАМЧЕНКОВА¹⁾, М. В. МАТВЕЕНКОВ²⁾

¹⁾Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины, ул. Советская, 104, 246039, Гомель, Беларусь

²⁾Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Беларусь

In vitro оценена способность ацетоновых и этанольных экстрактов из распространенных в Беларуси лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula* подавлять жизнеспособность опухолевых и стабильных клеточных линий. Экстракты из *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* цитотоксичны в отношении культур опухолевых клеток А-549, HeP-2С и MCF-7, а также неопухолегенной линии эпителиальных клеток человека HaCAT. Экстракт из лишайника *Ramalina pollinaria* нетоксичен в отношении трех изучаемых линий опухолегенных клеток, а также клеток кератиноцитов человека линии HaCAT. Динамика снижения жизнеспособности клеточных линий описывается S-образными кривыми. Специфичность цитотоксического действия экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* проявилась в отношении линии клеток MCF-7 ($IC_{50} = 3,86 \div 7,06$ мкг/мл; ИС = 1,44÷5,05). В отношении клеточных культур А-549 и HeP-2С экстракты с выраженным токсическим действием ($IC_{50} < 30,0$ мкг/мл) специфичностью не отличались (ИС $\leq 1,0$). Экстракт из лишайника *Ramalina pollinaria* при $IC_{50} = 40,55 \div 49,37$ мкг/мл отличался выраженной специфичностью в отношении культур опухолевых клеток (ИС = 1,46÷1,77).

Ключевые слова: экстракты из лишайников; культуры клеток; опухолевые клетки; жизнеспособность; полунгибирующая концентрация (IC_{50}); цитотоксичность; индекс специфичности (ИС).

Благодарность. авторы благодарят заведующую лабораторией комбинированных воздействий ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», кандидата биологических наук С. Н. Сушко, а также бывшего сотрудника ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси» Д. Р. Петреневу за помощь в организации выполнения исследования и конструктивные замечания при оценке полученных результатов.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF EXTRACTS FROM THE FOUR LICHEN SPECIES AGAINST HUMAN CANCER CELLS LINES

V. M. KHRAMCHANKOVA^a, M. V. MATVEYENKAU^b

^aFrancisk Skorina Gomel State University, Sovetskaya street, 104, 246019, Gomel, Belarus

^bInstitute of radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Fedyuninsky street, 4, 246007, Gomel, Belarus

Corresponding author: V. M. Khramchankova (hramchankova@gsu.by)

Образец цитирования:

Храмченкова О. М., Матвеевков М. В. Цитотоксическая активность экстрактов из четырех видов лишайников в отношении культур опухолевых клеток // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2018. № 2. С. 88–98.

For citation:

Khramchankova V. M., Matveyenkau M. V. Cytotoxic activity of extracts from the four lichen species against human cancer cells lines. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2018. No. 2. P. 88–98 (in Russ.).

Авторы:

Ольга Михайловна Храмченкова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники и физиологии растений.

Матвей Владимирович Матвеевков – младший научный сотрудник лаборатории комбинированных воздействий.

Authors:

Volga M. Khramchankova, PhD (biology), associate professor, associate professor of the department of botany and plant physiology.

hramchankova@gsu.by

Matsvei V. Matveyenkau, junior researcher of the laboratory of combined exposures.

matvey.matveenkov@mail.ru

In vitro evaluated the ability of acetone and ethanol extract from lichen species *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* and *Cladonia arbuscula* to inhibit the viability of human cancer and stable cell lines. Extracts from *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* and *Cladonia arbuscula* were cytotoxic against tumor cell lines A-549, HeP-2C and MCF-7, as well as against non-tumorigenic human epithelial cell line HaCAT. The lichen extract from *Ramalina pollinaria* was nontoxic against human cancer cell lines, as well as against human keratinocyte cells HaCAT. The dynamics of cell viability decrease lines is described by S-shaped curves. Specificity of the cytotoxic effect of extracts from lichens *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* and *Cladonia arbuscula* was manifested with respect to the MCF-7 cell line ($IC_{50} = 3,86 \div 7,06 \mu\text{g/ml}$; $SI = 1,44 \div 5,05$). For cell cultures A-549 and HeP-2C, extracts with a pronounced toxic effect ($IC_{50} < 30,0 \mu\text{g/ml}$) did not differ in specificity ($SI \leq 1,0$). The extract from *Ramalina pollinaria* at $IC_{50} = 40,55 \div 49,37 \mu\text{g/ml}$ was characterized by pronounced specificity for the cultures of tumor cells ($SI = 1,46 \div 1,77$).

Key words: lichen extracts; cell lines; tumor cells; viability; half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}); cytotoxicity; specificity index (SI).

Acknowledgments. The authors thank the head of the combined effects laboratory of the Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Ph.D. S.N. Sushko, as well as the former employee of the Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, D.R. Petrenev for assistance in organizing the implementation of the study and constructive comments when assessing the results.

Введение

Скрининг биологической активности вторичных метаболитов лишайников в настоящее время является актуальным. Известно свыше 20 тыс. видов лишайников, обитающих повсеместно, в том числе – в самых суровых условиях, где высшие растения существовать не могут. Описаны свойства более чем тысячи вторичных метаболитов лишайников, относящихся к депсидам, депсидонам, хинонам, ксантонам, терпеноидам, дибензофуранам и другим классам соединений. Установлены противовирусные, антимикробные, иммуномодулирующие, антиоксидантные, противоопухолевые, фотопротекторные и многие другие свойства экстрактов из лишайников, или выделенных из них лишайниковых веществ – атранорина, паритина, усниновой, леканоровой, физодовой и многих других «лишайниковых кислот» [1–7].

При всем многообразии имеющихся данных не решенными остаются многие задачи. Описания видового состава лишайников многих регионов далеки от завершения. Крайне недостаточно сведений о встречаемости и распространенности определенных видов лишайников. Имеющиеся сведения о составе, тем более о количестве вторичных метаболитов в талломах определенных видов лишайников нуждаются в постоянном уточнении. До настоящего времени нет единого мнения по вопросу, от каких факторов зависит количество и состав биологически активных веществ в биомассе данного вида лишайников, произрастающего в определенных условиях и на определенном субстрате. Одинаковы ли состав и содержание вторичных метаболитов в биомассе тех или иных видов лишайников, произрастающих на разных континентах, в различных условиях, на различных субстратах? Необходимы исследования, позволяющие оценить эффективность различных органических растворителей при извлечении тех или иных вторичных метаболитов из биомассы лишайников, или, по крайней мере, точно установить химический состав получаемых экстрактов. Последняя задача является тем более важной, что индивидуальные вещества, извлекаемые из лишайников, довольно легко могут быть синтезированы химическим путем, что ставит под сомнение необходимость их выделения из крайне медленно растущих талломов. В то же время, практика экстрагирования сырья из высших растений не исключает возможности химического синтеза содержащихся в них веществ, так как биологическая активность экстрактов отличается от таковой у определенных химических соединений.

Преодолению упомянутых и многих других проблем практического использования биомассы лишайников способствует накопление экспериментальных данных – скрининг биологической активности различных экстрактов и собственно вторичных метаболитов лишайников. Актуальность такого рода исследований подтверждается тем фактом, что экспериментальные данные, получаемые с использованием одних и тех же, или схожих методик, численно сильно отличаются, что вряд ли может быть объяснено только возможностями применяемого оборудования, характеристиками используемых реактивов, или иными методологическими отличиями, каковые еще предстоит преодолеть.

Данные о противоопухолевых свойствах лишайниковых веществ, сводка о которых приводится в обзорах [5–11], указывают на выраженное токсическое действие экстрактов и отдельных выделенных лишайниковых веществ, в отношении культур опухолевых клеток. Несмотря на единообразие методик оценки токсического действия (МТТ-тест, тест на клоногенный потенциал, анализ клеточного цикла), полученные результаты (например, величина концентрации полунгибирования – IC_{50}) весьма сильно

варьируют. Сказанное относится также к исследованиям, выполненным по выбранным нами или родственным видам лишайников [12–16].

Настоящее исследование посвящено *in vitro* оценке активности ацетоновых и этанольных экстрактов из четырех видов лишайников, широко распространенных в лесах юго-востока Беларуси – *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula* в отношении трех культур опухолевых клеток – MCF-7, A-549 и HeP-2C.

Материалы и методы исследования

Образцы лишайников отбирали в лесах Государственного лесохозяйственного учреждения «Гомельский лесхоз».

Гипогимния вздутая – *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (Syn. *Parmelia physodes* (L.) Ach.) – распространенный полиморфный вид листоватых лишайников семейства Parmeliaceae порядка Lecanorales класса Lecanoromycetes отдела Ascomycota. Встречается преимущественно на стволах и ветвях хвойных и березы, но растет и на всевозможных лиственных породах, а также на самых разнообразных других субстратах – опаде, отпаде, обработанной древесине и каменистом субстрате, иногда на почве. Содержит атранорин, хлоратранорин, физодовую, физодаловую, 3-гидроксифизиодовую, 2'-О-метилфизиодовую и протоцетраровую кислоты [17–20]. Биомассу лишайника отбирали на стволах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth.).

Эверния сливовая – *Evernia prunastri* (L.) Ach. – распространенный вид кустисто-листоватых лишайников семейства Parmeliaceae порядка Lecanorales класса Lecanoromycetes отдела Ascomycota. Встречается на стволах и ветвях хвойных и лиственных пород, опаде и отпаде, реже на камнях, содержит атранорин, усниновую и эверновую кислоты [17; 19; 21; 22]. Биомассу лишайника отбирали на стволах дуба черешчатого (*Quercus robur* L.).

Рамалина пыльцеватая – *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. – распространенный вид листовато-кустистых лишайников семейства Ramalinaceae порядка Lecanorales класса Lecanoromycetes отдела Ascomycota. Встречается на коре деревьев лиственных, реже хвойных пород, в хорошо освещенных, открытых местах. Редко на камнях. Содержит усниновую и эверновую кислоты [17; 19; 23]. Биомассу лишайника отбирали на стволах дуба черешчатого (*Quercus robur* L.).

Кладония лесная – *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. (Syn. *Cladonia sylvatica* (L.) Hoffm.) – распространенный вид кустистых лишайников семейства Cladoniaceae порядка Lecanorales класса Lecanoromycetes отдела Ascomycota. Обитает на песчаной почве, преимущественно в борах, на открытых местах, на старых пнях, обработанной древесине, реже по кочкам на сфагновых болотах. Содержит усниновую кислоту, по другим данным – усниновую, фумарпротоцетраровую, посромовую и урсоловую кислоты [17; 19; 24]. Биомассу лишайника отбирали на почве в сосняке лишайниковом.

Получение экстрактов из лишайников. Высушенную до воздушно-сухого состояния и измельченную биомассу лишайников экстрагировали в аппарате Сокслета. В табл. 1 приведены характеристики изучаемых экстрактов, присвоенная экстрактам нумерация сохраняется при изложении экспериментальных данных.

Таблица 1

Характеристика экстрактов из лишайников

Table 1

Characteristics of extracts from lichens

Номер экстракта	Вид лишайника	Экстрагент	Условия экстрагирования
1	<i>Hypogymnia physodes</i>	этанол	t = 78,3 °C
2	<i>Hypogymnia physodes</i>	ацетон	t = 56,3 °C
3	<i>Hypogymnia physodes</i>	ацетон	Предварительно – холодная мацерация гексаном в течение 7 суток, далее – в аппарате Сокслета при t = 56,3 °C
4	<i>Evernia prunastri</i>	ацетон	t = 56,3 °C
5	<i>Ramalina pollinaria</i>	ацетон	t = 56,3 °C
6	<i>Cladonia arbuscula</i>	ацетон	t = 56,3 °C
7	<i>Cladonia arbuscula</i>	этанол	t = 78,3 °C

Полноту экстракции контролировали стандартным способом [25]. Растворитель удаляли с помощью ротационного испарителя. Сухие экстракты хранили при комнатной температуре.

Подготовка стабильных клеточных линий. Использовали опухолегенные линии эпителиального происхождения MCF-7, A-549 и HeP-2C, а также эпителиальные клетки человека линии HaCAT (кератиноциты). Культуры клеток были получены в НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Замороженные при минус 80 °С образцы клеток переносили в стакан с водой, температура которой составляла 37 °С. После оттаивания пробирку обрабатывали спиртом, содержимое 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) [26]. После 5 мин центрифугирования (4 °С, 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 (АТСС) [26].

Инкубация клеток с экстрактами. В ячейки 96-луночного планшета вносили 100 мкл клеточной суспензии (5 000 клеток), инкубировали 24 часа при 37 °С и 5 % CO₂. 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 ч, суммарное время культивирования клеток в планшете – 72 часа. Инкубация проводилась в соответствии с рекомендацией протокола [27].

Определение метаболической активности клеток проводили с использованием МТТ-теста на скорость восстановления 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, M5655, Sigma) [28]. 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 °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 λ = 570 нм с использованием планшетного спектрофотометра TecanSafire II (США), для нормализации данных применяли измерения при λ = 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 λ = 570 нм.

Анализ результатов исследования производили с помощью программных продуктов GraphPadPrism-Trial (Version 5.02) и MicrosoftExcel.

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки противоопухолевой активности экстрактов из лишайников использовали три клеточные линии эпителиального происхождения: А-549 (карцинома легочного эпителия человека) [29], HeP-2C (линия-производная HeLa, карцинома эпителия шейки матки) [30], MCF-7 (линия рака молочной железы) [31]. В качестве культуры сравнения использовали спонтанно иммортализованную анеуплоидную линию кератиноцитов человека (HaCAT), являющуюся достаточно валидной моделью клеток кожи человека с хорошей воспроизводимостью результатов [32; 33].

Тест предполагал выявление наличия, или отсутствия культур-специфичного действия экстрактов из лишайников. В табл. 2 представлены результаты определения величин полуингибирующих концентраций экстрактов из лишайников на культуры клеток (IC₅₀).

Таблица 2

Цитотоксический эффект экстрактов из лишайников в отношении клеточных линий, оцененный с помощью МТТ-теста после 72 ч экспозиции (IC_{50} , мкг/мл)

Table 2

Cytotoxic effects of lichen extracts on cell lines assessed by MTT assay after 72 h exposure (IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$)

Номер экстракта	A-549	HeP-2C	MCF-7	HaCAT
1	19,1±2,22	36,8±0,90	7,1±0,33	19,6±7,21
2	27,3±1,31	35,2±1,46	4,1±0,99	19,7±4,53
3	13,8±4,17	44,0±4,34	3,9±1,54	19,5±4,20
4	23,9±6,84	32,8±3,93	5,6±1,14	20,2±0,97
5	49,4±2,99	40,6±2,16	49,9±4,15	71,9±3,15
6	24,6±1,59	22,5±2,00	4,2±0,45	11,2±1,10
7	29,8±7,69	29,9±2,65	59,4±12,95	12,1±1,08

В качестве критерия цитотоксичности экстрактов из лишайников в отношении культур клеток использовали данные Национального института онкологии США (National cancer institute, NCI), согласно которым сырой экстракт считается активным при $IC_{50} < 30$ мкг/мл [12; 34]. В отношении культуры A-549 данному критерию удовлетворяют экстракты 3 и 1; HeP-2C – экстракт 6; MCF-7 – экстракты 1, 2, 3, 4 и 6; HaCAT – все экстракты, кроме № 5. Культура HeP-2C оказалась наиболее устойчивой к действию изученных экстрактов; в отношении культур MCF-7 и HaCAT большинство экстрактов были высоко токсичными. Экстракт № 5 из лишайника *Ramalina pollinaria* может быть назван нетоксичным в отношении трех изучаемых линий опухолевых клеток, а также линии эпителиальных клеток человека HaCAT.

Способы получения экстрактов влияют на химический состав последних, что проявилось в их цитотоксическом действии в тех случаях, когда разные экстракты были получены из биомассы одного и того же вида лишайников – экстракты 1, 2 и 3; 6 и 7. Так, предварительная холодная мацерация биомассы *Hypogymnia physodes* гексаном проявилась в виде повышенной цитотоксичности ацетонового экстракта в отношении клеточных культур A-549 и MCF-7, пониженной – в отношении HeP-2C. Использование этанола и ацетона в качестве экстрагентов для биомассы *Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula* мало влияло на величину IC_{50} A-549 (*Cladonia arbuscula*), HeP-2C (*Hypogymnia physodes*) и HaCAT (*Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula*). Ацетоновые экстракты из *Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula* были эффективнее этанольных в отношении клеток MCF-7. Этанольные экстракты из *Hypogymnia physodes* были эффективнее ацетоновых в отношении клеток A-549. Наборы вторичных метаболитов *Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula* таковы, что в выбранных нами условиях экстрагирования извлекается лишь определенный набор этих веществ, а также комплекс других соединений, растворяющихся в этаноле, или ацетоне. При растворении экстрактов в ДМСО в раствор переходят лишь определенные фракции, оказывающие цитотоксическое действие. В этом смысле требует отдельного изучения действие экстракта 6 на культуру MCF-7 ($IC_{50} = 4,2 \pm 0,45$). Если считать, что главным вторичным метаболитом *Cladonia arbuscula* является усниновая кислота, то следует признать, что в данном случае из биомассы лишайника извлечено иное, биологически очень активное вещество, так как усниновая кислота в ацетоне практически не растворяется.

Зависимости жизнеспособности клеток от концентрации экстрактов из лишайников для клеточных линий A-549 и HeP-2C удовлетворительно описываются S-образными кривыми с коэффициентами аппроксимации $0,89 \div 0,95$ и $0,88 \div 0,95$, соответственно, – рис. 1 (а, б).

Для клеточной линии A-549 в диапазоне концентраций экстрактов 5 и 7 1–10 мкг/мл можно выделить зону умеренной стимуляции метаболизма клеток, за которой следует зона ингибирования жизнеспособности (рис. 1а). Эффект «стимуляции» метаболизма клеток может быть связан с увеличением проницаемости клеточных мембран, что в используемом нами тесте дает повышенную выработку формазана, по концентрации которого судят о метаболической активности. Под действием экстрактов 1, 3 и 4 IC_{10} достигался при концентрациях менее 1 мкг/мл, а IC_{90} – при концентрациях около 150 мкг/мл. Схожим было действие экстрактов 2 и 6: при близких значениях IC_{50} величины IC_{10} составлял 7,7 мкг/мл и 6,5 мкг/мл соответственно; IC_{90} – 40,6 мкг/мл и 39,4 мкг/мл соответственно.

Экстракт 4 оказывал схожее действие на клеточные линии А-549 и HeP-2С (рис. 1, а, б). Имел место отчетливый двухфазный клеточный ответ, выразившийся в 30–40 % ингибировании метаболической активности при концентрациях экстракта из лишайника около 1 мкг/мл, переходящем в плато на кривой с незначительным изменением жизнеспособности вплоть до концентраций свыше 10 мкг/мл, после чего значения IC_{90} достигались при концентрациях экстракта 148,5 мкг/мл и 71,3 мкг/мл соответственно.

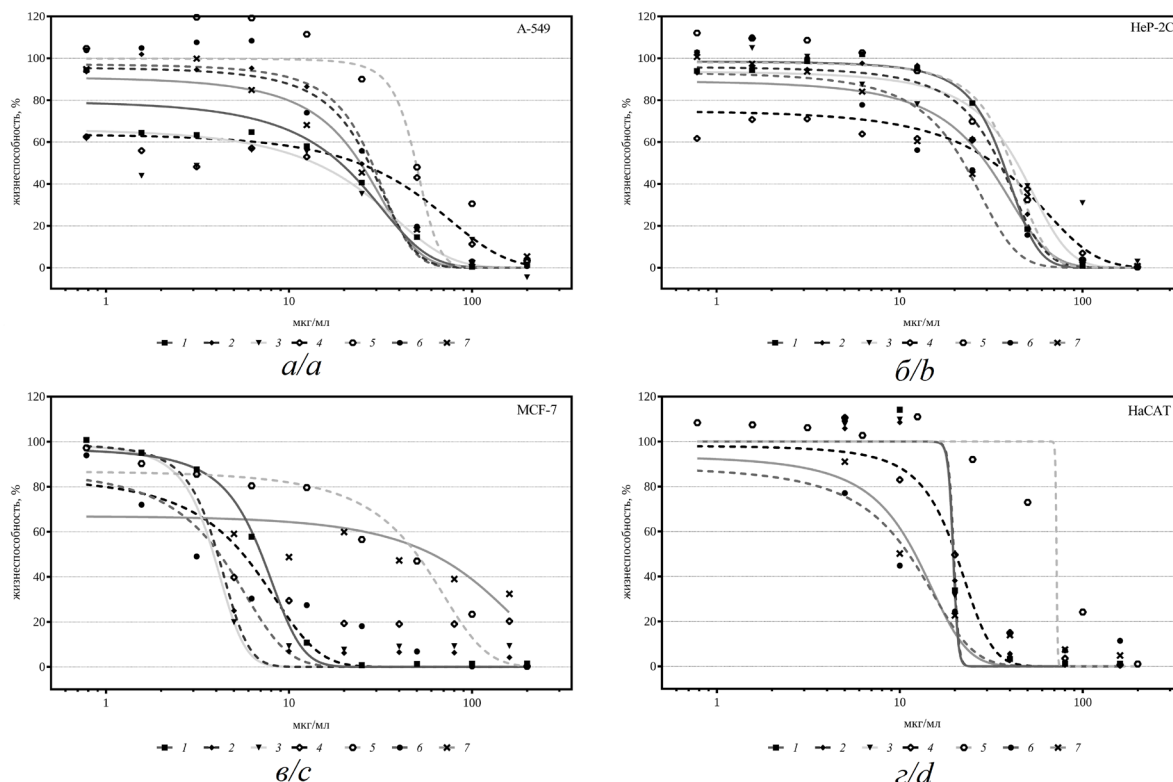


Рис. 1. Влияние концентрации экстрактов из лишайников на жизнеспособность культур клеток

Fig.1. Effect of lichen extracts concentration on the cell cultures viability

Для клеточной линии HeP-2C при действии экстрактов 1, 2, 3, 5, 6 и 7 установлены довольно близкие значения IC_{10} ($4,9 \div 14,3$) и IC_{90} ($32,4 \div 58,8$). После достижения концентраций полуингибирования клеточных культур увеличение содержания экстрактов из лишайников в среде культивирования на 20–60 процентов вызывает полное подавление жизнедеятельности клеток.

Такую особенность воздействия можно попытаться объяснить наличием в данных культурах специфичной мишени, которая реагирует на воздействие в малых дозах одного из компонентов экстракта из лишайника (скорее всего – присутствующего в наибольшем количестве). Фаза полного ингибирования жизнеспособности клеток может быть связана с вовлечением в процесс подавления их жизнедеятельности минорных вторичных метаболитов лишайника, концентрация которых градиентно возрастала.

Для линии MCF-7 имело место выраженное ингибирование метаболической активности клеток в диапазоне концентраций экстрактов из лишайников 1–3 мкг/мл (рис. 1в). Под действием всех изучаемых экстрактов значения IC_{10} достигались при концентрациях до 2,7 мкг/мл. Для культур, культивируемых в присутствии экстрактов 1, 2, 3, 4 и 6 величины IC_{50} и IC_{90} отличались на $16,9 \div 36,6$ %, то есть падение жизнеспособности клеток было стремительным и достигало 90 % при концентрациях экстрактов $8,3 \div 12,5$ мкг/г. Исключением были экстракты 5 и 7, для которых величины IC_{90} превышали 100 мкг/г.

Для линии HaCAT характер цитотоксического действия экстрактов из лишайников отличался. Так, экстракты 1, 2 и 3 оказывали практически одинаковое действие на клеточные культуры ($IC_{10} = 18,4 \div 18,6$ мкг/мл; $IC_{90} = 20,6 \div 20,8$ мкг/мл). Для экстрактов 4, 6 и 7 величины IC_{10} составили 9,2 мкг/мл, 2,3 мкг/мл и менее 1 мкг/мл при $IC_{90} = 20,4 \div 31,6$ мкг/мл. Исключением был экстракт 5, для которого $IC_{10} = 67,4$ мкг/мл, $IC_{90} = 75,6$ мкг/мл.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии выразительного культур-специфического действия экстрактов из лишайников. По степени чувствительности к экстрактам из лишайников тестируемые

культуры клеток можно расположить в ряд: MCF-7 > A-549 > HeP-2C. Примененная в настоящем исследовании методика дает возможность получить лишь общий показатель метаболической активности популяции клеток, не позволяющий судить о механизмах действия экстрактов из лишайников, и связанной с ними культур-специфичности. Поэтому упомянем о некоторых особенностях каждой культуры клеток, которые могут быть связанными с механизмами реализации клеточного ответа на действие экстрактов из лишайников. Так, у самой чувствительной из клеточных культур – MCF-7 – обнаружено наличие рецепторов для фактора некроза опухоли (ФНО-альфа), и при воздействии на данные рецепторы наблюдается внешне опосредованный апоптоз клеток данной линии [35]. Данная линия является эстроген-зависимой и существует ряд работ, показывающих, что воздействие на клетки антиэстрогенными веществами (в том числе – флавоноидами), может также подавлять жизнеспособность и рост опухоли [36; 37]. Следующая по чувствительности культура (A-549) способна экспрессировать немутантные белки-онкосупрессоры (p53, pRb) [38; 39], что может свидетельствовать о нормальном течении апоптоза в данных клетках при повреждении или дисфункции генетического аппарата [40]. Данные по самой устойчивой линии HeP-2C весьма немногочисленны. Данная клеточная линия является производной от культуры HeLa [41]. Это позволяет предположить, что она несет некоторые характеристики материнской линии. Работы [42–44] свидетельствуют, что растительные экстракты способны подавлять жизнеспособность клеток HeLa. Основным механизмом, по мнению авторов, является остановка клеточного цикла в G2/M фазе, а также индукция апоптоза, главным образом за счет полифенольных соединений.

Полученные данные подтверждают наличие выраженного токсического действия экстрактов из распространенных в Беларуси видов лишайников на культуры опухолевых клеток. Определенные нами значения IC_{50} согласуются с данными других исследователей, полученных на схожих культурах клеток для экстрактов из тех же и родственных видов лишайников [12–16]. Вместе с тем в работе [14] для ацетонового экстракта из *Hypogymnia physodes*, полученного особым способом, определенная величина IC_{50} в отношении культуры MCF-7 составляла $110,4 \pm 21,3$ мкг/мл. Это может доказывать отличия составов вторичных метаболитов представителей лишайников различных географических широт, но может также служить подтверждением соображений, изложенных выше.

Представляется целесообразным оценить цитотоксическую активность экстрактов из лишайников в отношении неопухологенной линии эпидермальных клеток человека для определения специфичности действия экстрактов.

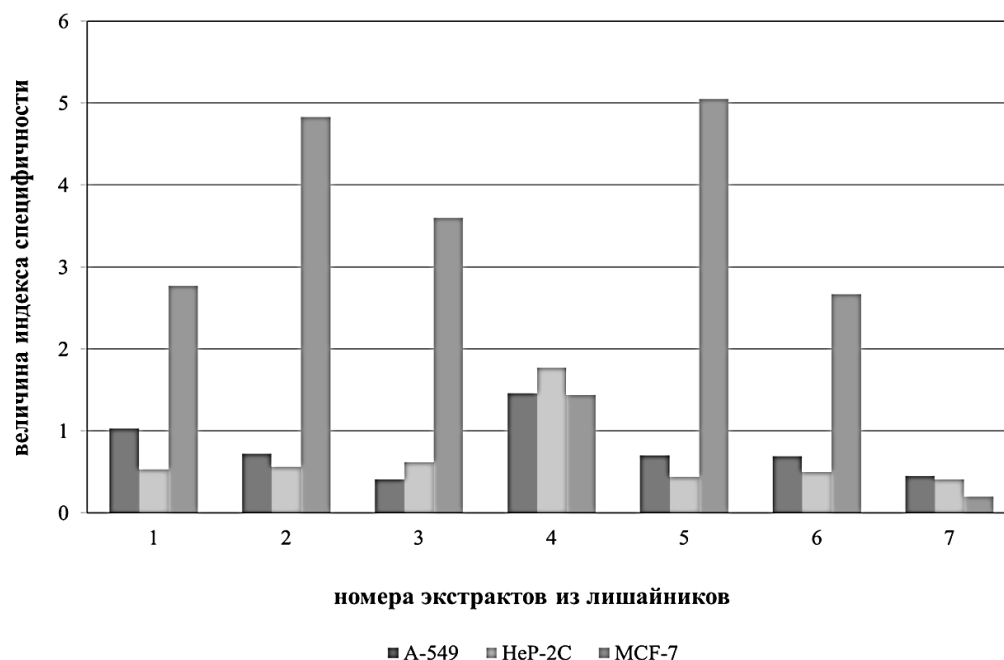


Рис. 2. Специфичность действия экстрактов из лишайников на опухолевые линии клеток

Fig. 2. Specificity of the effect of extracts from lichens on tumor cell lines

Индекс специфичности цитотоксического действия экстрактов из лишайников (ИС) вычисляли как отношение величин полуингибирующих концентраций (рис. 2) [13]:

$$ИС = \frac{IC_{50}(HaCAT)}{IC_{50}(X)},$$

где $IC_{50}(HaCAT)$ – величина полуингибирующей концентрации экстрактов из лишайников в отношении неопухолегенной линии клеток;

$IC_{50}(X)$ – величина полуингибирующей концентрации экстрактов из лишайников в отношении опухолегенной линии клеток.

Таким образом, специфичность цитотоксического действия экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* проявилась в отношении линии клеток рака молочной железы (MCF-7). При высокой токсичности (IC_{50} 3,9÷7,1 мкг/мл) экстрактов величины индекса специфичности составили 1,4÷5,1. В отношении клеточных культур А-549 и HeP-2С экстракты с выраженным токсическим действием ($IC_{50} < 30,0$ мкг/мл) специфичностью не отличались ($ИС \leq 1,0$).

Экстракт из лишайника *Ramalina pollinaria*, не будучи высоко токсичным (IC_{50} 40,6÷49,4 мкг/мл), отличался выраженной специфичностью в отношении культур опухолевых клеток (ИС 1,5÷1,8).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии цитотоксической активности экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula* в отношении опухолевых и стабильных клеточных линий.

Заключение

Установлено, что полученные различными способами ацетоновые и этанольные экстракты из распространенных в лесах Беларуси лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* характеризуются *in vitro* высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых и стабильных клеточных линий. Наиболее эффективными в отношении клеток культуры А-549 были экстракты из *Hypogymnia physodes*; в отношении HeP-2С – экстракты из *Cladonia arbuscula*, в отношении MCF-7 и HaCAT – экстракты из *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula*. Экстракт из лишайника *Ramalina pollinaria* был нетоксичен в отношении культур опухолевых клеток А-549, HeP-2С и MCF-7, а также неопухолегенной линии эпителиальных клеток человека HaCAT. Специфичность цитотоксического действия экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* и *Cladonia arbuscula* проявилась в отношении клеток линии MCF-7. Экстракт из лишайника *Ramalina pollinaria* при $IC_{50} = 40,6 \div 49,4$ мкг/мл отличался выраженной специфичностью действия в отношении культур опухолевых клеток (ИС 1,5 ÷ 1,8). Экстракты из лишайников, по-видимому, являются перспективными субстанциями для получения противоопухолевых препаратов на основе природного сырья.

Библиографические ссылки

1. Upreti D. K., Divakar P. K., Shukla V., et al., Recent Advances in Lichenology: in 2 vol. Vol. 2. New Delhi, 2015.
2. Ranković, B. Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential. Heidelberg; New York; London, 2015.
3. Huneck S., Yoshimura. I. Identification of lichen substances. Berlin; Heidelberg, 1996.
4. Nash III T. H. Lichen biology. Cambridge, 1999.
5. Shukla V., Upreti D. K., Bajpai R. Lichens to Biomonitor the Environment. Springer; India, 2014.
6. Shukla V., Joshi G. P., Rawat M. S. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review // Phytochemistry Reviews. 2010. Vol. 9, № 2. P. 303–314.
7. Molnar K. Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review // Z. Naturforsch. 2010. Vol. 65. P. 157–173.
8. Bhattacharyya S., Deep P. R., Singh S., et al. Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity // American J. of Pharm-Tech Research. 2016. Vol. 6, № 6. P. 29–44.
9. Boustie, J. Grube M. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites // Plant Genetic Resources. 2005. Vol. 3, № 2. P. 273–287.
10. Shrestha G., Clair L. L. S. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs // Phytochemistry reviews. 2013. Vol. 12, № 1. P. 229–244.
11. Gomez-Serranillos M. P., Fernández-Moriano C. González-Burgos E., et al. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features // RSC Adv. 2014. Vol. 4. P. 59017–59047.
12. Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., et al. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species // International J. of Molecular Sciences. 2011. Vol. 12, № 8. P. 5428–5448.
13. Bezivin C., Tomasi S., Lohezic-Le Devehat F. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines // Phytomedicine. 2003. Vol. 10, № 6–7. P. 499–503.

14. Studzińska-Sroka E., Piotrowska H., Kucińska M., et al. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines // *Pharmaceutical biology*. 2016. Vol. 54, № 11. P. 2480–2485.
15. Ari F., Celikler S., Oran S., et al. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells // *Environmental toxicology*. 2014. Vol. 29, № 7. P. 804–813.
16. Triggiani D., Ceccarelli D., Tiezzi A., et al. Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells // *Biologia*. 2009. Vol. 64, № 1. P. 59–62.
17. Smith C.W., Aptroot A., Coppins B. J., et al. *The Lichens of Great Britain and Ireland*. 2nd ed. London, 2009.
18. Копачевская Е. Г., Макаревич М. Ф., Окснер А. Н. и др. *Определитель лишайников СССР*. Вып. 1. Пергузариевые, Леканоровые, Пармелиевые. Л., 1971.
19. Вайнштейн Е. А., Равинская А. П., Шаниро И. А. *Справочное пособие по хемотаксономии лишайников: метод. пособие*. Л., 1990.
20. Molnar K., Farkas E. Depsides and depsidones in populations of the lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity // *Ann. Bot. Fennici*. 2011. Vol. 48. P. 473–482.
21. Голубкова Н. С., Домбровская А. В., Журбенко М. П. и др. *Определитель лишайников России*. Вып. 6. Алекториевые, Пармелиевые, Стереокаулоновые. СПб., 1996.
22. Kosanić M., Manojlović N., Janković S., et al. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents // *Food Chem. Toxicol.* 2013. Vol. 53. P. 112–118.
23. Андреев М. П., Гумельбрант Д. Е., Голубкова Н. С. и др. *Определитель лишайников России*. Вып. 10. Agyriaceae, Anamylopsoraceae, Arphanopsidaceae, Arthrographidaceae, Brigiatiaceae, Chrysotrichaceae, Clavariaceae, Ectolechiaceae, Gomphillaceae, Gypsoplacaceae, Lecanoraceae, Lecideaceae, Mycoblastaceae, Phlyctidaceae, Physciaceae, Pilocarpaceae, Psoraceae, Ramalinaceae, Stereocaulaceae, Vezdaeaceae, Tricholomataceae. СПб., 2008.
24. Голубкова Н. С., Савич, В. П., Трасс Х. Х. *Определитель лишайников СССР*. Вып. 5. Кладониевые – Акароспоровые. Л., 1978
25. *Воскресенский П. И. Техника лабораторных работ*. М., 1973.
26. American Type Culture Collection [Электронный ресурс]. 2018. URL: <https://www.atcc.org> (дата обращения: 09.01.2018).
27. Langdon Simon P. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Medicine). London, 2010.
28. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // *Biotechnology annual review*. 2005. Vol. 11. P. 127–152.
29. Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., et al. *In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors 2* // *J. of the National Cancer Institute*. 1973. Vol. 51, № 5. P. 1417–1423.
30. Moore A. E., Sabachewsky L., Toolan H. W. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells // *Cancer Research*. 1955. Vol. 15, № 9. P. 598–602.
31. Soule H. D., Vazquez A., Long A., et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma // *J. Nat. Cancer Inst.* 1973. Vol. 51. P. 1409–1413.
32. Colegate Steven M., Molyneux Russell J. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. London, 2009.
33. Schoop V. M., Fusenig N. E., Mirancea N. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic culture with human dermal fibroblasts // *J. of investigative dermatology*. 1999. Vol. 112, № 3. P. 343–353.
34. Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquaye E., et al. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer // *J. Ethnopharmacol.* 2004. Vol. 90. P. 33–38.
35. Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro // *Science*. 1985. Vol. 230. P. 943–945.
36. Gottardis M. M., Jiang, S. Y., Jeng, M. H., et al. Inhibition of tamoxifen-stimulated growth of an MCF-7 tumor variant in athymic mice by novel steroidal antiestrogens // *Cancer Research*. 1989. Vol. 49, №. 15. P. 4090–4093.
37. So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., et al. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen // *Cancer letters*. 1997. Vol. 112, № 2. P. 127–133.
38. Alexander B. Niculescu III, Chen X., Smeets M., et al. Effects of p21Cip1/Waf1 at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication // *Molecular and cellular biology*. 1998. Vol. 18, № 1. P. 629–643.
39. Rom W. N., Hay J. G., Lee T. C., et al. Molecular and genetic aspects of lung cancer // *Lung Cancer*. 2003. Vol. 2. P. 3–26.
40. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicologic pathology*. – 2007. Vol. 35, № 4. P. 495–516.
41. ECACC General Cell Collection: Hep-2C (HeLa derivative) [Электронный ресурс]. 2018. URL: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85020207&collection=ecacc_gc. (дата обращения: 09.01.2018).
42. Kim H., Mosaddik A., Gyawali R., et al. Induction of apoptosis by ethanolic extract of mango peel and comparative analysis of the chemical constituents of mango peel and flesh // *Food chemistry*. 2012. Vol. 133, № 2. P. 416–422.
43. Patel S., Gheewala N., Suthar A., et al. *In-vitro* cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line // *International J. of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2009. Vol. 1. № 1. P. 38–46.
44. Zhang Q., Zhang F., Thakur K., et al. Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells // *Food and Chemical Toxicology*. 2017. Vol. 112. P. 466–475..

References

1. Upreti D. K., Divakar P. K., Shukla V., et al., *Recent Advances in Lichenology: in 2 vol*. Vol. 2. New Delhi, 2015.
2. Ranković, B. *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*. Heidelberg; New York; London, 2015.
3. Huneck S., Yoshimura. I. *Identification of lichen substances*. Berlin; Heidelberg, 1996.
4. Nash III T.H. *Lichen biology*. Cambridge, 1999.
5. Shukla V., Upreti D. K., Bajpai R. *Lichens to Biomonitor the Environment*. Springer; India, 2014.

6. Shukla V., Joshi G. P., Rawat M. S. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2010. Vol. 9, No. 2. P. 303–314.
7. Molnar K., Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z. Naturforsch.* 2010. Vol. 65. P. 157–173.
8. Bhattacharyya S., Deep P. R., Singh S., et al. Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity. *American J. of Pharm-Tech Research*. 2016. Vol. 6, No. 6. P. 29–44.
9. Boustie, J. Grube M. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*. 2005. Vol. 3, No. 2. P. 273–287.
10. Shrestha G., Clair L. L. S. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry reviews*. 2013. Vol. 12, No. 1. P. 229–244.
11. Gomez-Serranillos M. P., Fernández-Moriano C., González-Burgos E., et al. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *RSC Adv*. 2014. Vol. 4. P. 59017–59047.
12. Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., et al. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. Vol. 12, No. 8. P. 5428–5448.
13. Bezivin C., Tomasi S., Lohezic-Le Devehat F., et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 2003. Vol. 10, No. 6–7. P. 499–503.
14. Studzińska-Sroka E., Piotrowska H., Kucińska M., et al. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines. *Pharmaceutical biology*. 2016. Vol. 54., No. 11. P. 2480–2485.
15. Ari F., Celikler S., Oran S., et al. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. *Environmental toxicology*. 2014. Vol. 29, No. 7. P. 804–813.
16. Triggiani D., Ceccarelli D., Tiezzi A., et al. Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells. *Biologia*. 2009. Vol. 64, No. 1. P. 59–62.
17. Smith C.W., Aptroot A., Coppins B. J., et al. The Lichens of Great Britain and Ireland. 2nd ed. London, 2009.
18. Kopachevskaya E. G., Makarevich M. F., Oksner A. N., et al. [Determinant of lichens of the USSR. Issue. 1. Pertusariaceae, Lecanoraceae, Parmeliaceae]. Leningrad, 1971 (in Russ.).
19. Vajnshtejn E. A., Ravinskaya A. P., Shapiro I. A. [A reference guide on the chemotaxonomy of lichens (methodical manual)]. Leningrad, 1990 (in Russ.).
20. Molnar, K. Depsides and depsidones in populations of the lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity. *Ann. Bot. Fennici*. 2011. Vol. 48. P. 473–482.
21. Golubkova N. S., Dombrovskaya A. V., Zhurbenko M. P. et al. [Determinant of lichens of the USSR. Issue. 6. Alectoriaceae, Parmeliaceae, tereocaulaceae]. St.-Petersburg. 1996 (in Russ.).
22. Kosanić M., Manojlović N., Janković S., et al. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem. Toxicol.* 2013. Vol. 53. P.112–118.
23. Andreev M. P., Gimelbrant D. E., Golubkova N. S., et al. [Determinant of lichens of Russia. Issue. 10. Agyriaceae, Anamylopsoraceae, Aphanopsidaceae, Arthrorhaphidaceae, Brigantiaeaceae, Chrysotrichaceae, Clavariaceae, Ectolechiaceae, Gomphillaceae, Gypsoplacaceae, Lecanoraceae, Lecideaceae, Mycoblastaceae, Phlyctidaceae, Physciaceae, Pilocarpaceae, Psoraceae, Ramalinaceae, Stereocaulaceae, Vezdaeaceae, Tricholomataceae]. St.-Petersburg, 2008 (in Russ.).
24. Golubkova N. S., Savich, V. P., Trass X. X. [Determinant of lichens of the USSR. Issue. 5. Cladoniaceae – Acarosporaceae]. Leningrad, 1978 (in Russ.).
25. Voskresenskij P. I. [Technique of laboratory works]. Moscow, 1973 (in Russ.).
26. American Type Culture Collection [Electronic resource]. 2018. URL: <https://www.atcc.org> (data of access: 09.01.2018).
27. Langdon Simon P. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine). London, 2010.
28. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005. Vol. 11. P. 127–152.
29. Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., et al. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors 2. *J. of the National Cancer Institute*. 1973. Vol. 51, No. 5. P. 1417–1423.
30. Moore, A. E., Sabachewsky L., Toolan H. W. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Research*. 1955. Vol. 15, No. 9. P. 598–602.
31. Soule H. D., Vazquez A., Long A., Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 1973. Vol. 51. P. 1409–1413.
32. Colegate Steven M., Molyneux Russell J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. London, 2009.
33. Schoop V. M., Fusenig N. E., Mirancea N. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic culture with human dermal fibroblasts. *J. of investigative dermatology*. 1999. Vol. 112, No. 3. P. 343–353.
34. Itharat A., Houghton P. J., Eno-Amooquaye E., et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol.* 2004. Vol. 90. P. 33–38.
35. Sugarman, B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*. 1985. Vol. 230. P. 943–945.
36. Gottardis, M. M., Jiang, S. Y., Jeng, M. H., et al. Inhibition of tamoxifen-stimulated growth of an MCF-7 tumor variant in athymic mice by novel steroidal antiestrogens. *Cancer Research*. 1989. Vol. 49, No. 15. P. 4090–4093.
37. So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., et al. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer letters*. 1997. Vol. 112, No. 2. P. 127–133.
38. Alexander B. Niculescu III, Chen X., Smeets M., et al. Effects of p21Cip1/Waf1 at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and cellular biology*. 1998. Vol. 18, No. 1. P. 629–643.
39. Rom W. N., Hay J. G., Lee T. C., et al. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Lung Cancer*. 2003. Vol. 2. P. 3–26.
40. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007. Vol. 35, No. 4. P. 495–516.
41. ECACC General Cell Collection: Hep-2C (HeLa derivative) [Electronic resource]. 2018. URL: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85020207&collection=ecacc_gc. (data of access: 09.01.2018).

42. Kim H., Mosaddik A., Gyawali R., et al. Induction of apoptosis by ethanolic extract of mango peel and comparative analysis of the chemical constituents of mango peel and flesh. *Food chemistry*. 2012. Vol. 133, No. 2. P. 416–422.
43. Patel S., Gheewala N., Suthar A., et al. In-vitro cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line. *International J. of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2009. Vol. 1. No. 1. P. 38–46.
44. Zhang Q., Zhang F., Thakur K., et al. Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2017. Vol. 112. P. 466–475.

Статья поступила в редколлегию 10.05.2018
Received by editorial board 10.05.2018