

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

МЕДИЦИНА
MEDICINE

УДК 576.5:630*813.2:582.29
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-65-75>

Поступило в редакцию 29.09.2021
Received 29.09.2021

М. В. Матвеев¹, О. М. Храмченкова², И. А. Чешик¹

¹*Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*
²*Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины, Гомель, Республика Беларусь*

**ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ФОТОМОДИФИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ
ИЗ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЛИШАЙНИКОВ ЮГО-ВОСТОКА БЕЛАРУСИ**

(Представлено членом-корреспондентом Н. С. Сердюченко)

Аннотация. Анализировали фотомодифицирующий и цитотоксический профиль, полученный для 35 экстрактов, выделенных из пяти видов распространенных лишайников юго-востока Беларуси. По результатам исследования, экстракты были разделены на токсичные и нетоксичные в отношении кератиноцитов человека (НАСаТ). Была выявлена зависимость количественных показателей токсичности экстрактов от вида лишайника, в меньшей степени, от условий экстрагирования. Выявлены экстракты, снижающие токсическое действие ультрафиолета на клетки кожи и обладающие фотосенсибилизационными свойствами. Выделена группа экстрактов, проявивших свойства модификаторов облучения, снижая или увеличивая чувствительность клеток человека, в зависимости от используемой концентрации. Статистический анализ факторов, связанных с модификацией экстрактами эффектов облучения, показал наибольшее влияние на данный показатель применяемых для экстрагирования растворителей. Большинство экстрактов демонстрирует фотозащитные и фотосенсибилизационные эффекты в диапазоне концентраций экстрактов от 2,5 до 5 мкг/мл. Увеличение концентрации до 10 мкг/мл в среднем усиливает их фотосенсибилизационные свойства. Методами вариационной статистики подтверждены значимые концентрационно-зависимые изменения фотомодифицирующих свойств ряда экстрактов.

Ключевые слова: экстракты из лишайников, культуры кератиноцитов (НАСаТ), ультрафиолет, полунгибирующая доза (ID_{50}), полунгибирующая концентрация (IC_{50}), фотомодификация, факторы, множественная регрессия

Для цитирования. Матвеев, М. В. Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из распространенных лишайников юго-востока Беларуси / М. В. Матвеев, О. М. Храмченкова, И. А. Чешик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 65–75. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-65-75>

M. V. Matveyenkau¹, V. M. Khranchankova², I. A. Cheshik¹

¹*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*

²*Francisk Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus*

**CYTOTOXIC AND PHOTOMODIFYING PROPERTIES OF EXTRACTS
FROM THE DISTRIBUTED LICHENS OF THE SOUTH-EAST OF BELARUS**

(Communicated by Corresponding Member Nikolay S. Serdyuchenko)

Abstract. The photomodifying and cytotoxic profile obtained for thirty-five extracts isolated from five species of distributed lichens in the South-East of Belarus was analyzed. According to the research results, the extracts were classified as toxic and non-toxic to human keratinocytes (HACaT). The dependence of the quantitative toxicity indicators of extracts on the lichen species, to a lesser extent, on the extraction conditions was revealed. Extracts that reduce the toxic effect of ultraviolet radiation on skin cells and possess photosensitizing properties were revealed. A group of the extracts that revealed the properties of a radiation modifier was identified. The statistical analysis of the factors associated with the modification of the radiation effects by extracts showed the greatest influence on this indicator of the solvents used for extraction. Most of the extracts

show both the photoprotective and photosensitizing effects in the extract concentration range from 2.5 to 5 µg/ml. Increasing the concentration to 10 µg/ml, on average, enhances their photosensitizing properties. The statistical analysis confirmed the significant concentration-dependent changes in the photomodifying properties of a number of extracts.

Keywords: lichen extracts, keratinocyte culture (HACaT), ultraviolet, median lethal dose (ID₅₀), median lethal concentration (IC₅₀), photomodification, factors, multiple regression

For citation. Matveyenkau M. V., Khramchankova V. M., Cheshik I. A. Cytotoxic and photomodifying properties of extracts from the distributed lichens of the South-East of Belarus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 65–75 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-65-75>

Введение. Поиск и разработка новых солнцезащитных соединений является актуальной и не разрешенной задачей. Существует ряд исследованных и запатентованных субстанций, способствующих снижению повреждающего кожу действия ультрафиолета [1]. Существующие по данной тематике работы дают представления о свойствах фотозащитных веществ, которые могут обуславливаться изменением экзогенных воздействий на клетки: снижение поглощенной дозы, снабжение клеток веществами с антиоксидантными свойствами; а также модуляцией эндогенных: изменение активности провоспалительных и прооксидантных ферментов, экспрессия про- и антиапоптотических генов и т. д. [2–4]. В настоящее время привлекательными представляются соединения и их комплексы, извлеченные из живых организмов различных таксономических групп, приспособленных к условиям повышенной инсоляции. Данные соединения демонстрируют способность комплексно изменять токсическое действие ультрафиолета одновременно ингибируя экзо- и эндогенные факторы [5].

К ряду таких фоторезистентных организмов относятся и лишайники [6; 7]. Существуют исследования, показавшие способность извлеченных из лишайников веществ снижать непосредственно дозы ультрафиолета и проявлять биологически активные эффекты в отношении клеток человека (антиоксидантные, антиапоптотические, противовоспалительные и т. д.) [8–10]. Однако имея достаточный научный задел для обозначения данных эффектов, до сих пор нельзя с уверенностью сказать об исчерпывающей изученности всех аспектов возможного биотехнологического применения лишайниковой биомассы. Слабо представлена информация о собственных цитотоксических свойствах лишайниковых веществ в отношении эпидермальных клеток человека, позволяющая выделить субтоксичные дозировки экстрактов. Отсутствует информация о влиянии на их фотомодифицирующие свойства: условий экстрагирования, доз ультрафиолета, концентрационно-зависимых эффектов и, наконец, видовой и эколого-географической принадлежности лишайника. Все это ставит ряд актуальных проблем, решению которых может помочь широкий скрининг цитотоксических и фотомодифицирующих характеристик лишайниковых веществ и их комплексов.

Цель работы – оценка влияния экспериментальных факторов на цитотоксические и фотомодифицирующие характеристики различных фракций веществ, выделенных из пяти распространенных видов лишайников юго-востока Беларуси – *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina* – в отношении кератиноцитов человека HACaT.

Материалы и методы исследования. *Получение экстрактов лишайников.* Биомассу лишайников отбирали на типичных для каждого вида субстратах, сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали, экстрагировали метанолом и ацетоном в аппарате Сокслета. Растворитель удаляли, экстракты высушивали до порошкообразного состояния, после чего использовали для исследований.

Подготовка стабильных клеточных линий. Использовали эпителиальные клетки человека линии HACaT (кератиноциты). Культуры клеток были получены в НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Режим культивирования стандартный: 37°C, 90 % влажности воздуха с 5 %-ным содержанием CO₂, коэффициент субкультивирования 1/5. Состав среды: DMEM/F-12, 11039 GIBCO; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин-В; 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HiClone Inc).

Инкубация клеток с экстрактами. Культуры кератиноцитов преинкубировали в 96-луночных планшетах до достижения ими фазы экспоненциального роста. Затем вносили в лунки планшета раствор экстракта, серийно разведенный в питательной среде, в диапазоне концентраций 200–0,78 (мкг/мл). По прошествии 48 ч оценивали жизнеспособность клеток по методу, описанному ниже. Подробно схема инкубации описана в [11].

Для определения модификации фототоксических эффектов после периода преинкубации в планшете культуры кератиноцитов пошагово экспонировали в каждом ряду лунок планшета заданное время на поверхности стеклянного УФ-фильтра системы гель-документации Chemidoc (Bio-Rad), предварительно добавив в питательную среду растворы экстрактов лишайников в концентрациях 2,5; 5,0 и 10,0 мкг/мл. Использовали параметры и схему облучения, описанные в [12]. Жизнеспособность клеточных популяций кератиноцитов в эксперименте устанавливали с помощью МТТ-теста, определяющего метаболическую активность клеток – тест на скорость восстановления 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, М5655, Sigma) [13].

Для статистической проверки гипотез о различии действия отдельных экстрактов сравнивали параметры экспериментальных кривых выживаемости клеток сопоставлением вложенных регрессионных моделей методом F-теста. Для оценки связи экспериментальных факторов и исследуемых свойств экстрактов использовали метод множественной регрессии, с кодировкой категориальных независимых переменных. Анализ результатов исследования производили с помощью программных продуктов GraphPad Prism (Version 8.01) и Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Сравнивали цитотоксическое действие семи различных экстрактов, полученных из талломов пяти видов лишайников. Для этого определяли динамику воздействия градиента их концентраций на жизнеспособность клеточных популяций кератиноцитов. В качестве аналитической величины использовали концентрацию экстрактов, ингибирующую 50 % жизнеспособности клеток (IC_{50}), являющуюся количественным выражением их общетоксического потенциала. Для выявления диапазона и характера изучаемого эффекта определяли концентрации, снижающие жизнеспособность клеток на 10 и 90 % (IC_{10} и IC_{90} , табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Различные аналитические величины цитотоксического эффекта экстрактов из лишайников в отношении клеточных линий, оцененные с помощью МТТ-теста после 48 ч инкубации

Table 1. Different values of the cytotoxic effect of lichen extracts on cell lines, assessed by the MTT test after 48 hours of incubation

Экстракт Extract	IC_{50} , мкг/мл	IC_{10} , мкг/мл	IC_{90} , мкг/мл	
<i>Cladonia arbuscula</i>	ацетон	11,16 ± 1,11	<1,00	17,52
	бензол	27,04 ± 3,61	<1,00	>200
	гексан	27,75 ± 2,39	15,40	50,02
	метанол	79,3 ± 10,57	15,80	>200
	хлороформ	20,71 ± 1,76	4,86	71,22
	этанол	12,12 ± 1,08	<1,00	18,21
	этилацетат	32,56 ± 2,15	16,37	59,55
<i>Evernia prunastri</i>	ацетон	20,20 ± 0,93	8,26	38,23
	бензол	52,32 ± 5,70	13,96	>200
	гексан	52,41 ± 3,23	28,44	86,57
	метанол	116,60 ± 12,22	45,8	>200
	хлороформ	52,75 ± 4,87	22,06	>200
	этанол	113,10 ± 6,40	41,68	192,90
	этилацетат	68,97 ± 8,19	41,13	>200
<i>Hypogimnia physodes</i>	ацетон	19,7 ± 4,52	18,32	21,15
	бензол	37,06 ± 4,20	<1,00	102
	гексан	32,72 ± 2,18	22,53	47,26
	метанол	73,1 ± 5,42	26,2	>200
	хлороформ	27,65 ± 2,43	12,85	59,27
	этанол	19,6 ± 7,2	18,05	20,90
	этилацетат	33,98 ± 2,11	14,59	80,40

Окончание табл. 1

Экстракт Extract	IC ₅₀ , мкг/мл	IC ₁₀ , мкг/мл	IC ₉₀ , мкг/мл	
<i>Ramalina pollinaria</i>	ацетон	66,90 ± 5,43	30,39	145,4
	бензол	36,19 ± 2,85	<1,00	79,57
	гексан	48,61 ± 4,05	27,67	85,37
	метанол	106,30 ± 13,24	60,80	188,40
	хлороформ	52,88 ± 6,93	20,35	>200
	этанол	63,10 ± 9,13	21,76	237,8
	этилацетат	76,35 ± 4,70	38,18	172
<i>Xanthoria parietina</i>	ацетон	152,00 ± 18,23	33,75	>200
	бензол	136,4 ± 33,03	10,28	>200
	гексан	>200	4,378	>200
	метанол	>200	2,28	>200
	хлороформ	28,29 ± 5,33	3,70	>200
	этанол	161,30 ± 41,30	7,09	>200
	этилацетат	41,72 ± 6,20	9,66	>200

Сравнение IC₅₀ экстрактов с критериальным значением (IC₅₀ < 30 мкг/мл), рекомендованным Национальным институтом рака США (NCI) [14], позволило разделить экстракты на токсичные и нетоксичные. Таким образом, у вида *Cladonia arbuscula* цитотоксичные следующие экстракты: ацетоновый, бензольный, гексановый, хлороформный, этанольный. У вида *Hypogimnia physodes*: ацетоновый, хлороформный, этанольный. У вида *Evernia prunastri* лишь ацетоновый экстракт, в свою очередь у *Xanthoria parietina* – только хлороформный. Экстракты, извлеченные из вида *Ramalina pollinaria*, не проявили себя как достаточно токсические субстанции при всех исследуемых условиях экстрагирования.

Оценку факторов, обуславливающих цитотоксический профиль изучаемых экстрактов, проводили с помощью множественной регрессии характеристики общетоксического потенциала (IC₅₀) от двух экспериментальных факторов: «вид лишайника» и «экстрагент». По показателю коэффициента множественной регрессии фактор «вид лишайника» обладал наибольшим влиянием на изменение цитотоксичности экстрактов и обуславливал 50,3 % ($R^2 = 0,503$; $p = 0,0002$) вариации показателя (рис. 1). По показателям бета-коэффициентов вид *Cladonia arbuscula* обуславливает наибольшую цитотоксичность экстрактов ($\beta = -35,65$ мкг/мл; $p = 0,0108$), экстракты вида *Hypogimnia physodes* в среднем чуть менее цитотоксичны ($\beta = -30,91$ мкг/мл; $p = 0,0251$).

В свою очередь вид *Xanthoria parietina* обуславливает снижение цитотоксичности экстрактов в среднем увеличивая полуингибирующую концентрацию ($\beta = 65,65$ мкг/мл; $p = 0,0001$). Вид *Evernia prunastri* не вносит значительных изменений в анализируемый показатель ($\beta = 2,31$ мкг/мл; $p = 0,8612$). Влияние фактора «экстрагент» в целом невелико и статистически не значимо ($R^2 = 0,21$; $p = 0,3148$). Достаточно сильным влиянием на вариацию признака обладает только метанол, в среднем снижая цитотоксичность экстрактов ($\beta = 49,32$ мкг/мл; $p = 0,0259$).

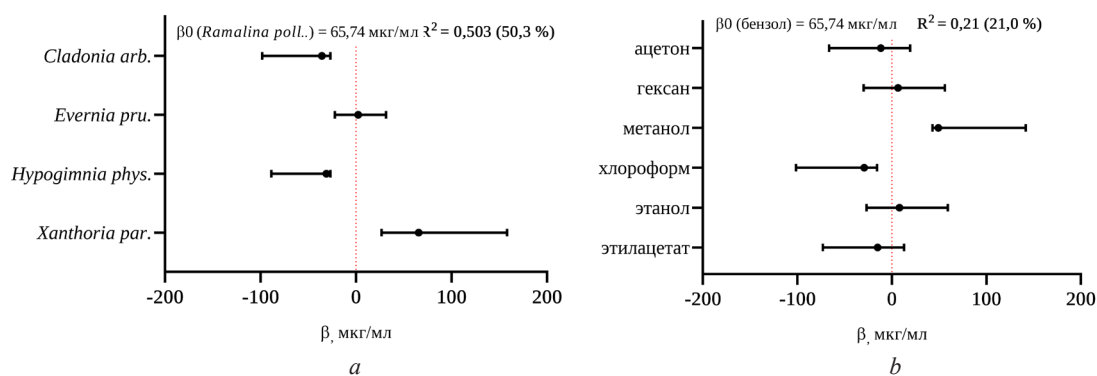


Рис. 1. Влияние различных экспериментальных факторов на цитотоксические свойства экстрактов

Fig. 1. Influence of various experimental factors on the cytotoxic properties of extracts

Можно сделать вывод о преобладающем влиянии фактора видовой принадлежности лишайника на цитотоксические свойства извлеченных из него веществ. Использование лишайников вида *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* в среднем увеличивает цитотоксичность полученных экстрактов и приближает значение их полуингибирующих концентраций к токсичным по принятому критерию ($IC_{50} < 30$ мкг/мл). Применение видов *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria* позволяет получить экстракты со средним уровнем цитотоксичности. Извлечения из вида *Xanthoria parietina* в среднем на 65,65 мкг/мл менее активны в сравнении с полученными из других видов. Учитывая общую неоднозначность влияния используемых растворителей на анализируемый показатель, достаточно значимым можно признать лишь снижение цитотоксической активности веществ, извлеченных с помощью метанола.

Попарное сравнение силы и характера цитотоксичности отдельных экстрактов, обусловленных видовой принадлежностью взятого для их получения лишайника, выявило определенные типы различий. Так можно выделить экстракты, схожие по общетоксическому потенциалу (параметр IC_{50} при $p = 0,0638–0,9882$), но имеющие различные биологические эффекты и/или характер их взаимодействия (параметр: коэффициент угла наклона кривой при $p = 0,0001–0,0477$): *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* – бензольные, метанольные, этилацетатные; *Cladonia arbusucla* и *Ramalina pollinaria* – бензольные; *Cladonia arbusucla* и *Xanthoria parietina* – хлороформные, этилацетатные; *Evernia prunastri* и *Hypogimnia physodes* – ацетоновые, бензольные; *Evernia prunastri* и *Xanthoria parietina* – этанольные. Также можно отметить противоположную группу экстрактов, имеющих значительно различающийся общетоксический потенциал ($p = 0,0001–0,0477$), но при этом обладающие схожим характером действия ($p = 0,0517–0,9825$): *Cladonia arbusucla* и *Evernia prunastri* – ацетоновые, гексановые, хлороформные; *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* – этанольные; *Cladonia arbusucla* и *Ramalina pollinaria* – все кроме ацетоновых и бензольных; *Cladonia arbusucla* и *Xanthoria parietina* – хлороформные, этилацетатные; *Evernia prunastri* и *Hypogimnia physodes* – ацетоновые, бензольные; *Evernia prunastri* и *Xanthoria parietina* – этанольные; *Hypogimnia physodes* и *Xanthoria parietina* – хлороформные. Данные соображения подтверждаются также соотношением изучаемых аналитических параметров кривой выживаемости клеток (IC_{10} , IC_{50} , IC_{90}).

Попарная проверка гипотезы о различиях цитотоксичности отдельных экстрактов внутри вида выявила наличие значимых различий в цитотоксическом потенциале (при $p = 0,0001–0,0365$) экстрактов вида *Evernia prunastri*, полученных на растворителях разной химической природы, в то время как у экстрактов из вида *Ramalina pollinaria* – схожей ($p = 0,0001–0,0262$). Экстракты из *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* проявили различное цитотоксическое действие в случае извлечения веществ схожими растворителями (хлороформ и гексан, метанол и этанол и т. д., $p = 0,0001–0,0489$), так и в случае с экстрагентами различной природы (бензол и этанол, метанол и хлороформ и т. д. при $p = 0,0001–0,0195$). Различие в действии экстрактов из вида *Xanthoria parietina* обусловлены ярко выраженной цитотоксичностью хлороформных и этилацетатных экстрактов относительно других, полученных из данного вида лишайника ($p = 0,0001$).

Для сравнения фотомодифицирующих свойств экстрактов строили кривые динамики жизнеспособности кератиноцитов в условиях наращивания доз ультрафиолета. Далее определяли аналитическую величину: дозу половинного ингибирования жизнеспособности клеток (ID_{50}). Отношение полулетальных доз излучения для клеток (фактор изменения цитотоксичности, ФИЦ) служило количественной мерой эффектов фотомодификации:

$$\text{ФИЦ} = \frac{ID_{50}(\text{опыт})}{ID_{50}(\text{контроль})},$$

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. Концентрации экстрактов в питательной среде – 2,5, 5 и 10 мкг/мл – были выбраны по критерию отсутствия выраженных токсических свойств для большинства экстрактов. На основании статистического анализа полученных величин экстракты были разделены на фотопротекторные и фотосенсибилизирующие (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Величины модификации цитотоксического действия ультрафиолета экстрактами из лишайников в отношении эпидермальных клеток человека HAcAT

T a b l e 2. Values of modification of the cytotoxic effect of ultraviolet radiation by lichen extracts on human epidermal cells HAcAT

Экстракт Extract		ID ₅₀ , мДж/см ² ФИЦ		
		2,5 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл
<i>Cladonia arbuscula</i>	ацетон	5,83 ± 0,31	3,87 ± 0,88	1,11 ± 1,00
		1,53	1,02	0,29
	бензол	2,12 ± 0,19	1,51 ± 0,17	0,58 ± 0,08
		0,56	0,40	0,15
	гексан	0,01 <	0,01 <	0,01 <
		0,01 <	0,01 <	0,01 <
	метанол	5,40 ± 0,51	5,44 ± 0,70	5,06 ± 0,65
1,42		1,43	1,33	
хлороформ	2,10 ± 0,18	0,25 ± 0,07	0,01 <	
	0,55	0,06	0,01 <	
этанол	5,69 ± 0,19	5,38 ± 0,61	4,14 ± 0,41	
	1,50	1,41	1,09	
этилацетат	0,15 ± 0,07	0,01 <	0,01 <	
	0,04	0,01 <	0,01 <	
<i>Evernia prunastri</i>	ацетон	2,94 ± 0,09	2,99 ± 0,12	2,81 ± 0,12
		0,77	0,79	0,74
	бензол	4,20 ± 0,45	3,05 ± 0,63	0,40 ± 0,12
		1,11	0,80	0,11
	гексан	5,93 ± 0,61	4,86 ± 0,75	0,18 ± 0,07
		1,56	1,28	0,05
	метанол	6,70 ± 0,33	7,03 ± 0,54	7,62 ± 0,58
1,76		1,85	2,01	
хлороформ	3,69 ± 0,70	2,37 ± 0,42	0,22 ± 0,11	
	0,97	0,62	0,06	
этанол	2,70 ± 0,20	2,90 ± 0,16	2,41 ± 0,13	
	0,71	0,76	0,63	
этилацетат	4,20 ± 0,65	2,92 ± 0,60	1,08 ± 0,20	
	1,10	0,77	0,29	
<i>Hypogimnia physodes</i>	ацетон	2,27 ± 0,12	2,49 ± 0,10	2,76 ± 0,11
		0,67	0,72	0,73
	бензол	6,88 ± 0,60	4,74 ± 0,86	0,31 ± 0,17
		1,61	1,25	0,08
	гексан	5,34 ± 0,70	4,23 ± 0,46	0,14 ± 0,07
		1,41	1,11	0,04
	метанол	7,69 ± 0,45	7,23 ± 0,55	5,68 ± 0,60
2,02		1,90	1,49	
хлороформ	3,58 ± 0,55	2,81 ± 0,59	0,41 ± 0,12	
	0,94	0,74	0,11	
этанол	2,57 ± 0,19	2,47 ± 0,15	2,51 ± 0,10	
	0,68	0,65	0,66	
этилацетат	4,23 ± 0,44	3,37 ± 0,61	0,82 ± 0,20	
	1,11	0,89	0,22	
<i>Ramalina pollinaria</i>	ацетон	4,80 ± 0,37	5,23 ± 0,26	4,72 ± 0,36
		1,26	1,38	1,24
	бензол	6,30 ± 0,67	4,57 ± 0,76	0,29 ± 0,20
		1,66	1,20	0,08
	гексан	5,28 ± 0,82	2,95 ± 0,63	0,11 ± 0,06
		1,39	0,78	0,03
	метанол	7,55 ± 0,29	8,04 ± 0,70	9,74 ± 1,00
1,99		2,12	2,62	
хлороформ	5,69 ± 0,62	4,76 ± 0,70	0,67 ± 0,22	
	1,50	1,25	0,18	
этанол	6,28 ± 0,37	6,80 ± 0,61	6,76 ± 0,48	
	1,65	1,79	1,78	
этилацетат	4,51 ± 0,54	4,93 ± 0,60	2,24 ± 0,22	
	1,19	1,30	0,59	

Окончание табл. 2

Экстракт Extract		ID ₅₀ , мДж/см ² ФИЦ		
		2,5 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл
<i>Xanthoria parietina</i>	ацетон	2,24 ± 0,23 0,59	1,59 ± 0,25 0,42	1,23 ± 0,21 0,32
	бензол	0,30 ± 0,06 0,06	0,24 ± 0,10 0,08	0,29 ± 0,06 0,06
	гексан	1,29 ± 0,24 0,34	0,35 ± 0,09 0,09	0,18 ± 0,06 0,05
	метанол	5,13 ± 0,60 1,35	5,09 ± 0,29 1,34	3,88 ± 0,57 1,02
	хлороформ	0,89 ± 0,18 0,23	1,11 ± 0,24 0,29	0,73 ± 0,19 0,19
	этанол	2,98 ± 0,33 0,78	2,29 ± 0,30 0,60	2,33 ± 0,16 0,61
	этилацетат	0,48 ± 0,09 0,13	0,51 ± 0,13 0,13	0,34 ± 0,15 0,09

Примечание. Жирным шрифтом отмечено достоверное отличие полулетальной дозы от контрольной (ID₅₀ = 3,77 ± 0,47 мДж/см²) при $p = 0,05$.

Note. Bold type shows a significant difference of a semi-lethal dose from a control one (ID₅₀ = 3.77 ± 0.47 mJ/cm²) at $p = 0.05$.

К экстрактам, обладающим фотопротекторным действием, можно отнести: этанольные из *Cladonia arbuscula* и *Ramalina pollinaria*; ацетоновый из *Ramalina pollinaria*, а также метанольные из *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Стоит отметить фотопротекторный эффект метанольного экстракта из *Cladonia arbuscula* в концентрации 5 мкг/мл, уровень значимости которого близок к взятому статистическому критерию ($p = 0,0565$). Перечисленные экстракты способны снижать токсическое действие ультрафиолета в 1,34–2,62 раза. Максимальные фотозащитные свойства проявил метанольный экстракт из *Ramalina pollinaria* в концентрации 10 мкг/мл, минимальные – метанольный из *Xanthoria parietina* в той же концентрации.

Выраженными эффектами сенсibilизации цитотоксического действия ультрафиолета обладали следующие экстракты: бензольный, гексановый, хлороформный и этилацетатный из *Cladonia arbuscula*; ацетоновый, бензольный, хлороформный и этилацетатный из *Evernia prunastri*; ацетоновый, хлороформный, этанольный и этилацетатный из *Hypogimnia physodes*; а также все экстракты из *Xanthoria parietina* кроме метанольного. Количественно данная способность проявилась в увеличении токсического потенциала облучения в 1,35–27,01 раз. Максимальный эффект данной группы проявился у этилацетатного экстракта из *Cladonia arbuscula* в концентрации 2,5 мкг/мл, минимальный – у хлороформного из *Hypogimnia physodes* в той же концентрации. Отдельно в данной группе стоит выделить хлороформный и этилацетатный экстракты из *Cladonia arbuscula* в концентрации 5–10 мкг/мл, а также гексановый того же вида во всех концентрационных точках, как способные полностью подавлять жизнеспособность кератиноцитов при воздействии самых малых субтоксичных доз излучения.

Выделена группа модификаторов облучения – экстрактов, способных проявлять как фотопротекторные, так и фотосенсibilизационные свойства в зависимости от их концентрации в питательной среде. К данной группе относятся экстракты из *Cladonia arbuscula* (ацетон), *Evernia prunastri* (гексан), *Hypogimnia physodes* (бензол, гексан), *Ramalina pollinaria* (хлороформ). Количественные эффекты модификации имеют определенную концентрационную зависимость. Добавление экстрактов в концентрации 2,5 мкг/мл снижает токсическое действие излучения в 1,50–1,61 раз. Увеличение концентрации в два раза снижает выживаемость кератиноцитов в условиях облучения до контрольного уровня. Дальнейшее увеличение экстракта в питательной среде приводит к выраженным эффектам сенсibilизации, увеличивая чувствительность кератиноцитов к ультрафиолету в 6,56–26,39 раз.

Выбор растворителя оказал наибольшее влияние на фотомодификационные свойства экстрактов, обуславливая 40,4 % ($R^2 = 0,404$; $p = 0,0001$) вариации полулетальной дозы ультрафиолета. Внесение в питательную среду веществ, извлеченных метанолом, в среднем увеличивает полулетальную дозу ультрафиолета для клеток по сравнению с контрольной на 2,70 мДж/см² ($p = 0,0005$). В свою очередь, использование таких растворителей, как гексан, хлороформ и этилацетат достоверно снижает равноэффективную дозу на 1,7–1,8 мДж/см². Меньшим влиянием на фотомодификационные свойства экстрактов обладает видовая принадлежность лишайника и используемая концентрация, обуславливая 21,9 и 11,4 % вариации полулетальной дозы соответственно ($R^2 = 0,219$ и $0,114$; $p = 0,0001$ и $0,0036$). Использование экстрактов из лишайника *Xanthoria parietina* увеличивает чувствительность клеток к излучению в среднем на 2,19 мДж/см² ($p = 0,0074$).

Увеличение концентрации большинства экстрактов в питательной среде до 10 мкг/мл также увеличивает сенсibilизационные свойства экстрактов на 1,74 мДж/см² ($p = 0,030$).

Выявлен ряд тенденций изменения фотомодификационных свойств отдельных экстрактов (рис. 2). У этанольных экстрактов из *Cladonia arbuscula* и *Ramalina pollinaria*, метанольных из *Hypogimnia physodes* и *Ramalina pollinaria* подтверждено достоверное увеличение защитного эффекта с ростом концентрации ($p = 0,0003–0,0405$). Увеличение фотосенсibilизационной активности, увеличивающейся с ростом концентрации в питательной среде ($p = 0,0001–0,0458$), подтверждено у экстрактов из *Cladonia arbuscula* (бензольный и хлороформный), *Evernia prunastri* (бензольный, хлороформный и этилацетатный), *Hypogimnia physodes* (хлороформный и этилацетатный), *Xanthoria parietina* (гексановый). У всех экстрактов из вышеупомянутой группы модификаторов изменение с ростом концентрации эффектов фотопротекции на сенсibilизацию является достоверным ($p = 0,0001–0,0364$).

Таким образом, оценен ряд факторов, обуславливающих способность экстрактов изменять эффекты облучения клеток в сторону фотопротекции и/или сенсibilизации. С одной стороны,

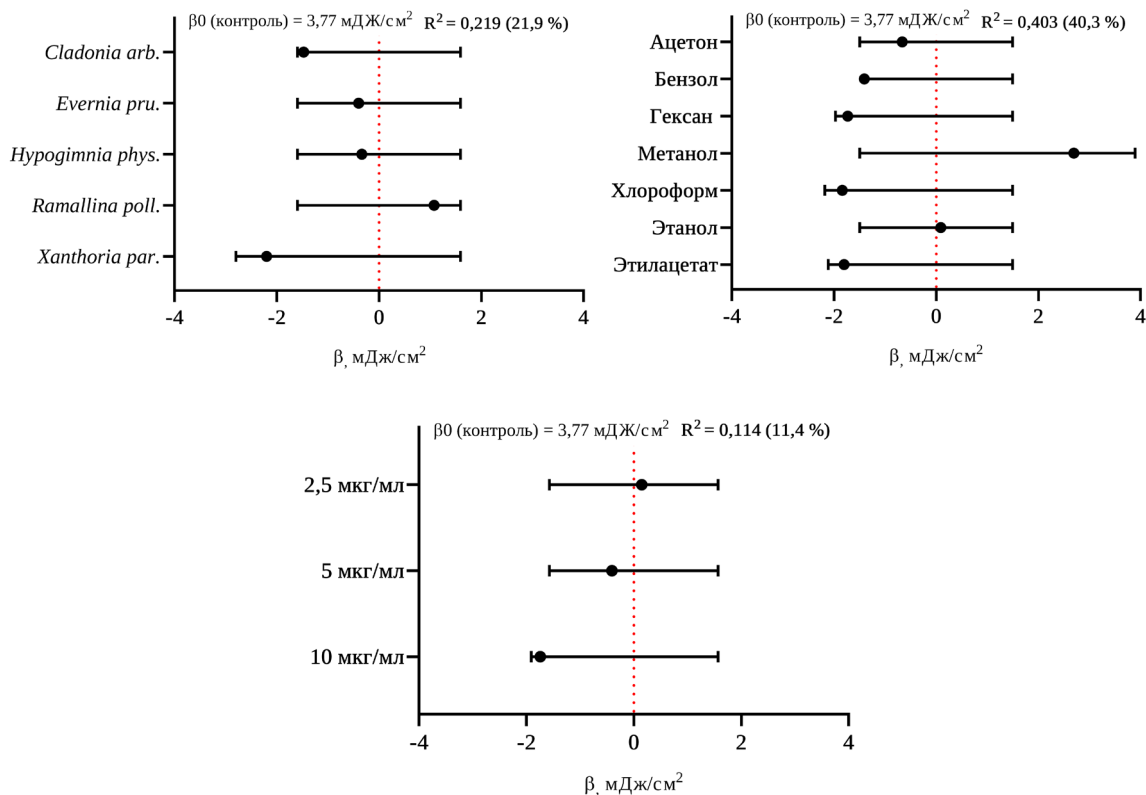


Рис. 2. Влияние различных экспериментальных факторов на фотомодификационные свойства экстрактов

Fig. 2. Influence of various experimental factors on the photomodification properties of extracts

это является обоснованием практического применения ряда извлечений в качестве компонентов солнцезащитного состава для получения управляемого эффекта модификации воздействия ультрафиолета на клетки. С другой стороны, полученный перечень фотомодифицирующих характеристик наглядно демонстрирует возможность получения отдельных веществ у ряда экстрактов, обладающих как защитными, так и сенсibiliзирующими свойствами, и указывает на минимально необходимый концентрационный диапазон данного поиска.

Заключение. Выявлен ряд экстрактов, характеризующихся отсутствием выраженных цитотоксических эффектов на эпидермальные клетки человека: метанольный и этилацетатный из *Cladonia arbusucla*; бензольный, гексановый, метанольный, этилацетатный из *Hypogimnia physodes*; бензольный, гексановый, метанольный, хлороформный, этанольный и этилацетатный из *Evernia prunastri*; ацетоновый, бензольный, гексановый, метанольный, этанольный и этилацетатный из *Xanthoria parietina*; а также все экстракты из вида *Ramalina pollinaria*. Остальные экстракты охарактеризованы как токсичные по выбранному критерию. Наибольшим влиянием на цитотоксические свойства извлеченных из лишайника веществ обладает фактор видовой принадлежности, обуславливая 50,3 % вариации данного признака. Экстракты из видов *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* в среднем более токсичны, в то время как извлечения из вида *Xanthoria parietina* менее токсичны. Влияние используемого набора растворителей на цитотоксичность экстрактов в целом невелико и статистически не значимо. Исключением является экстракция метанолом, которая снижает цитотоксические свойства полученных субстанций.

Выявлено ослабление токсических эффектов воздействия ультрафиолета на кератиноциты в 1,34–2,62 раза при их культивировании с экстрактами: этанольным из *Cladonia arbusucla*, этанольным и ацетоновым из *Ramalina pollinaria*, а также с метанольными из видов *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Ряд экстрактов – ацетоновый из *Cladonia arbusucla*, гексановый из *Evernia prunastri*, бензольный и гексановый из *Hypogimnia physodes*, хлороформный из *Ramalina pollinaria* – показали себя в роли модификаторов облучения, изменяя свои свойства с фотопротекторных на сенсibiliзационные, по мере увеличения их концентрации в питательной среде, увеличивая и снижая цитотоксичность ультрафиолета до 26,39 и 1,50 раз соответственно. Обнаружены фотосенсibiliзационные эффекты, способные увеличивать токсическое действие ультрафиолета в 1,35–27,01 раз у следующих экстрактов: бензольные и хлороформные из *Cladonia arbusucla*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*; бензольные и этилацетатные из *Evernia prunastri* и *Cladonia arbusucla*; гексановый из *Cladonia arbusucla*; этанольный из *Hypogimnia physodes*; а также все экстракты из *Xanthoria parietina*, кроме метанольного.

Наибольшим влиянием на фотомодификационные свойства экстрактов обладает фактор выбора экстрагента, обуславливая 40,4 % вариации данной характеристики. Вещества, извлеченные метанолом, проявляют в среднем фотопротекторные свойства, увеличивая полулетальную для клеток дозу на 2,70 мДж. Растворители – гексан, хлороформ и этилацетат – в среднем обуславливают фотосенсibiliзационные эффекты, снижая полулетальную дозу облучения на 1,7–1,8 мДж. Анализ экспериментальных факторов «вид» и «концентрация» позволяет сделать вывод о смещении модификации облучения большинством экстрактов из *Xanthoria parietina* в сторону сенсibiliзации, а также проявлении аналогичных свойств при увеличении концентрации до 10 мкг/мл у всех экстрактов.

Список использованных источников

1. Parker, F. R. Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration: Authority and Responsibility / F. R. Parker // FDA Administrative Enforcement Manual. – Boca Raton, 2005. – Ch. 1. – P. 21–60. <https://doi.org/10.1201/9781420037838-6>
2. Serpone, N. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products / N. Serpone, D. Dondi, A. Albini // Inorganica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 360, N 3. – P. 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
3. Bureš, F. Fundamental aspects of property tuning in push–pull molecules / F. Bureš // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4, N 102. – P. 58826–58851. <https://doi.org/10.1039/c4ra11264d>
4. 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, N 2. – P. 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.11.003>

5. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>
6. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats / L. Nybakken [et al.] // *Oecologia*. – 2004. – Vol. 140, N 2. – P. 211–216. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1583-6>
7. UV-induction of sun-screening pigments in lichens / K. A. Solhaug [et al.] // *New Phytologist*. – 2003. – Vol. 158, N 1. – P. 91–100. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00708.x>
8. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
9. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens / F. Rancan [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 2002. – Vol. 68, N 2–3. – P. 133–139. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(02\)00362-7](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(02)00362-7)
10. Ranković, B. Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential / B. Ranković. – New York, 2015. – 202 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8>
11. Храменкова, О. М. Цитотоксическая активность экстрактов из четырех видов лишайников в отношении культур опухолевых клеток / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология*. – 2018. – № 2. – С. 88–98.
12. Храменкова, О. М. Фотозащитная активность экстрактов из пяти видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология*. – 2018. – № 4. – С. 52–62.
13. Van Meerloo, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay / J. Van Meerloo, G. J. L. Kaspers, J. Cloos // *Cancer cell culture*. – Totowa, 2011. – Ch. 20. – P. 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
14. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species / T. Mitrović [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – Vol. 12, N 8. – P. 5428–5448. <https://doi.org/10.3390/ijms12085428>

References

1. Parker F. R. Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration: Authority and Responsibility. *FDA Administrative Enforcement Manual*. Boca Raton, 2005, ch. 1, pp. 21–60. <https://doi.org/10.1201/9781420037838-6>
2. Serpone N., Dondi D., Albini A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and skincare products. *Inorganica Chimica Acta*, 2007, vol. 360, no. 3, pp. 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
3. Bureš F. Fundamental aspects of property tuning in push–pull molecules. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no. 102, pp. 58826–58851. <https://doi.org/10.1039/c4ra11264d>
4. Yeager D. G., Lim H. W. What's New in Photoprotection: A Review of New Concepts and Controversies. *Dermatologic Clinics*, 2019, vol. 37, no. 2, pp. 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.11.003>
5. Takshak S., Agrawal S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, vol. 193, pp. 51–88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>
6. Nybakken L., Solhaug K. A., Bilger W., Gauslaa Y. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia*, 2004, vol. 140, no. 2, pp. 211–216. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1583-6>
7. Solhaug K. A., Gauslaa Y., Nybakken L., Bilger W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist*, 2003, vol. 158, no. 1, pp. 91–100. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00708.x>
8. Radice M., Manfredini S., Ziosi P., Dissette V., Buso P., Fallacara A., Vertuani S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*, 2016, vol. 114, pp. 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
9. Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernández E., Hidalgo M. E., Quihot W., Quihot W., Rubio C., Boehm F., Piazena H., Oltmanns U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002, vol. 68, no. 2–3, pp. 133–139. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(02\)00362-7](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(02)00362-7)
10. Ranković B. *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*. New York, 2015. 202 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8>
11. Храменкова О. М., Матвеевков М. В. Cytotoxic activity of extracts from the four lichen species against human cancer cells lines. *Zhurnal belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya = Journal of the Belarusian State University. Ecology*, 2018, no. 2, pp. 88–98 (in Russian).
12. Храменкова О. М., Матвеевков М. В. Photoprotective activity of extracts from the five lichen species against human keratinocyte (HaCAT). *Zhurnal belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya = Journal of the Belarusian State University. Ecology*, 2018, no. 4, pp. 52–62 (in Russian).
13. Van Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture*. Totowa, 2011, ch. 20, pp. 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
14. Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., Tošić S., Stanković M., Radojević I., Stefanović O., Čomić L., Đaćić D., Čurčić M., Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, vol. 12, no. 8, pp. 5428–5448. <https://doi.org/10.3390/ijms12085428>

Информация об авторах

Матвеевков Матвей Владимирович – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: matvey.matveenkov@mail.ru.

Храмченкова Ольга Михайловна – канд. биол. наук, доцент. Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины (ул. Советская, 104, 246019, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: hramchen-kova@gsu.by.

Чешик Игорь Анатольевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: igor.cheshik@gmail.com.

Information about the authors

Matveyenkau Matsvei V. – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: matvey.matveenkov@mail.ru.

Khramchankova Volga M. – Ph. D. (Biology), Associate Professor. Francisk Skorina Gomel State University (104, Sovetskaya Str., 246019, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: hramchenkova@gsu.by.

Cheshik Ihar A. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Director. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: igor.cheshik@gmail.com.