

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 569.323.4:616.24-006-092.9]:561.29

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-474-483>

Поступило в редакцию 13.04.2021

Received 13.04.2021

**С. В. Гончаров, И. А. Чешик***Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь***МОДИФИКАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЭФФЕКТОВ В ЛЕГКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ЭКСТРАКТАМИ ЛИШАЙНИКОВ***(Представлено членом-корреспондентом Н. С. Сердюченко)*

**Аннотация.** На моделях спонтанного и индуцированного канцерогенеза в легких у мышей линии Af исследованы противоопухолевые свойства распространенных лишайников Беларуси: *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*. Через 20 недель после окончания перорального приема водных экстрактов лишайников (1 г/л) в течение 28 суток при отсутствии воздействия канцерогена из 4 видов только *C. arbuscula* показала проканцерогенные свойства, повысив среднее число легочных аденом на мышь почти вдвое. *R. pollinaria* и *E. prunastri* не провоцировали спонтанный канцерогенез и оказывали корректирующее действие, заметно уменьшив число аденом на мышь на 21 и 45 % соответственно. Для проведения индуцированного канцерогенеза спустя 2 недели приема водных экстрактов мышам вводили внутривентриально уретан (1 г/кг). Анализ общего числа аденом на мышь показал проопухолевую тенденцию для *C. arbuscula*, а анализ числа аденом от 1 мм и выше показал такую же тенденцию для *H. physodes*. Данные экстракты не влияют на долю уретановых аденом различного размера в их общей сумме, но увеличивают частоту случаев с высоким выходом аденом различного размера; при этом заметно большую проканцерогенную активность по частоте случаев с высоким выходом аденом от 1 мм и более имеет *H. physodes*. Анализ общего числа уретановых аденом на мышь, а также аденом от 1 мм показал противоопухолевую тенденцию для *R. pollinaria* и проопухолевую – для *E. prunastri*. Прием *E. prunastri* повышал частоту случаев с высоким выходом аденом различного размера наряду с заметным возрастанием частоты случаев с низким выходом аденом. В случае с *R. pollinaria* возрастание частоты случаев с низким выходом аденом выгодно дополнялось резким снижением частоты случаев с высоким выходом. В результате эксперимента *E. prunastri* проявила как проканцерогенную активность, так и противоопухолевые свойства, а *R. pollinaria* показала выраженный противоопухолевый потенциал.

**Ключевые слова:** *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, легочная аденома, уретан

**Для цитирования.** Гончаров, С. В. Модификация опухолевых эффектов в легких лабораторных мышей экстрактами лишайников / С. В. Гончаров, И. А. Чешик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 4. – С. 474–483. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-474-483>

**Sergey V. Goncharov, Igor A. Cheshik***Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus***MODIFYING THE TUMOR EFFECTS IN THE LUNGS OF LABORATORY MICE WITH LICHEN EXTRACTS***(Communicated by Corresponding Member Nikolay S. Serduchenko)*

**Abstract.** The anti-tumor properties of common lichens of Belarus: *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri* were studied using the models of spontaneous and induced carcinogenesis in mice Af lungs. Without exposing to a carcinogen in 20 weeks after taking aqueous lichen extracts (1 g/l) of 4 species for 28 days, only *C. arbuscula* showed the pro-carcinogenic properties almost doubling the average number of pulmonary adenomas per mouse. *R. pollinaria* and *E. prunastri* did not provoke spontaneous carcinogenesis and had a corrective effect significantly reducing the number of adenomas per mouse by 21 and 45 %, respectively. To carry out induced carcinogenesis, after 2 weeks of taking aqueous extracts, mice were injected intraperitoneally with urethane (1 g/kg). The analysis of the total number of adenomas per mouse showed a pro-tumor tendency for *C. arbuscula*, and the analysis of the number of adenomas of 1 mm and more showed that for *H. physodes*. The extracts do not affect the proportion of urethane adenomas of various sizes in their total number, but increase the incidence of high-yield adenomas of various sizes; at the same time, *H. physodes* has a much greater pro-carcinogenic activity according to the incidence of high-yield adenomas of 1 mm or more. The analysis of the total number of urethane adenomas per mouse, as well as adenomas of 1 mm showed an anti-tumor tendency for *R. pollinaria*

and a pro-tumor tendency for *E. prunastri*. Taking *E. prunastri* increased the incidence of high-yield adenomas of various sizes, along with a notable increase in the incidence of low-yield adenomas. In the case of *R. pollinaria*, the increase in the incidence of low-yield adenomas was supplemented by a sharp decrease in the incidence of high-yield adenomas. As a result of the experiment, *E. prunastri* has exhibited both the pro-carcinogenic activity and the anti-tumor properties, but *R. pollinaria* has revealed a pronounced anti-tumor potential.

**Keywords:** *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, pulmonary adenoma, urethane

**For citation.** Goncharov S. V., Cheshik I. A. Modifying the tumor effects in the lungs of laboratory mice with lichen extracts. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 4, pp. 474–483 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-474-483>

**Введение.** Адаптация лишайников к жестким условиям, в т. ч. излучению, способствовала синтезу в них богатого состава уникальных вторичных метаболитов и сделала их биохимически уникальными. Большинство метаболитов имеет природу фенолов, дибензофуранов, депсидов, депсидонов, депсонов, лактонов, хинонов и защищает лишайник от свободных радикалов, генерируемых УФ-лучами. Лишайники являются идеальной моделью для изучения биологически активных метаболитов, демонстрирующих большой фармацевтический потенциал [1; 2]. Известны сотни биологически активных вторичных метаболитов лишайников с широким спектром действия: антисептического, антиоксидантного, фотопротекторного и др. Наряду с этим важной задачей остается выявление их противоопухолевой активности, в т. ч. при воздействии факторов канцерогенеза. Ведущим звеном в этиологии рака является совокупность различных экзогенных и эндогенных факторов: ионизирующее и УФ излучения, химические канцерогены, наследственная предрасположенность к канцерогенезу, вирусные инфекции и дисфункции иммунной и эндокринной системы [3].

Одним из перспективных направлений научных разработок является профилактика опухолей лишайниковыми субстанциями и создание эмпирически подобранных рецептур на основе комплексов биологически активных соединений, слагающих талломы лишайников.

Для предварительного отбора субстанций с потенциальными противоопухолевыми свойствами (скрининга) в эксперименте используются, в основном, клеточные культуры *in vitro*. Для отбора средств, предназначенных для терапии солидных опухолей, более перспективны модели спонтанных и индуцированных канцерогенами новообразований *in vivo* как соответствующие наблюдаемым у человека опухолям [4].

Для тестирования и оценки эффективности антиканцерогенных веществ чаще всего используются модели опухолей, индуцированные в различных органах-мишенях у лабораторных грызунов с помощью химических канцерогенов. Преимуществом моделей индуцированных опухолей является стандартизация процесса, возможность изучения влияния исследуемых субстанций на различные стадии (инициацию, промоцию, прогрессию), как и относительно небольшая продолжительность опытов (обычно в пределах 6–12 мес.).

Критериями наличия антиканцерогенных свойств у тестируемых субстанций являются: уменьшение частоты индуцируемых и спонтанных опухолей, их множественности, размеров, увеличение латентного периода их развития. На ранних сроках таких исследований может регистрироваться также развитие предопухолевых изменений, определяемых по биомаркерам опухолевого риска, учитывается также системное действие исследуемых субстанций на метаболизм, нейроэндокринную и иммунную системы.

Без какой-либо оценки *in vivo* и клинических испытаний реальная эффективность в терапии рака не может быть доказана для любого из потенциальных агентов. Во-первых, известно, что большинство противоопухолевых исследований экстрактов лишайников *in vivo* было проведено японскими учеными в 1970-х годах [5; 6]. В качестве базовой скрининговой модели обычно использовались аллогенные опухолеобразующие асциты S-180, имплантированные мышам-альбиносам. Некоторые противоопухолевые анализы были проведены с карциномой Эрлиха. С прогрессом в выделении и характеристике вторичных метаболитов лишайников растет интерес к тестированию их противоопухолевых эффектов *in vitro* и исследованиям *in vivo* [7]. Лишь для некоторых низкомолекулярных соединений лишайников были проведены анализы *in vivo* на мышах.

Одной из первых лишайниковых кислот, у которой обнаружена некоторая активность на моделях L1210 и S-180 у мышей, был дигидроксихинон, выделенный из *Stictacoronata* [8]. Было доказано, что хорошо известная (+) усниновая кислота обладает слабым противоопухолевым действием в отношении карциномы легких Льюиса и лейкозных клеток P-388 [9]. Серия из 20 соединений лишайника была протестирована против карцином Эрлиха у мышей, выявив некоторый потенциал в ингибировании роста опухоли для бутиролактонов – (+) протолихестериновой кислоты и нефростериновой кислоты [10]. Значительная противоопухолевая активность описывается для дикетопиперазиндиона, который с его производными показал мощную цитотоксическую активность *in vitro* (для культур мышинной лейкемии P-388, P-815 и MCF-7) [11; 12]. Инкапсуляция усниновой кислоты в микросферах из поли(молочной-гликолевой) кислоты в другом исследовании способствовала увеличению на 21 % в ингибировании саркомы-180 по сравнению с лечением свободной усниновой кислотой. В итоге усниновая кислота была эффективно инкапсулирована в микросферы PLGA, а микрокапсулирование улучшило ее противоопухолевую активность [7].

Селективность в отношении разрушения раковых клеток без нанесения вреда здоровым клеткам является ведущим направлением. За последние 20–30 лет некоторые исследования с лишайниками показали постоянное выявление противоопухолевых метаболитов [13–15], в которых потенциал вторичных метаболитов лишайников действительно многообразен.

Цель настоящей работы – изучить противоопухолевые свойства широко распространенных в Беларуси видов лишайников на моделях спонтанного и индуцированного канцерогенеза у мышей линии Af.

**Материалы и методы исследования.** В серии экспериментов на мышах линии Af были исследованы противоопухолевые свойства распространенных лишайников Беларуси: *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*. Талломы лишайников были собраны, высушены до воздушно-сухого состояния, измельчены на кафедре ботаники ГГУ им Ф. Скорины и предоставлены доцентом канд. биол. наук О. М. Храменковой для дальнейших исследований. Мыши Af в возрасте 2,5–3 мес. находились на стандартной диете в виварии. С возрастом у мышей этой линии повышается выход некоторых спонтанных опухолей. Были сформированы экспериментальные группы мышей, которые принимали с питьевой водой экстракты указанных лишайников (1 г/л) в течение 4 недель. Для моделирования канцерогенных эффектов (легочные аденомы) спустя 2 недели приема водных экстрактов части мышей вводили внутривентриально 10 %-ный раствор уретана (этилкарбамата) в физрастворе в расчете 1 г уретана/кг веса. Спустя 20 недель после окончания приема водных экстрактов лишайников экспериментальных животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом, выделяли легкие и фиксировали их в 10 %-ном формалине. Подсчет спонтанных (без уретана) и уретан-индуцированных аденом в легких проводили через 2 недели после фиксации.

**Результаты и их обсуждение.** Содержащиеся в лишайниках метаболиты во многих исследованиях часто показывают свою антиоксидантную, цитотоксическую (на культурах клеток), противораковую активность. При этом в опытах *in vivo* (особенно на проонкогенной линии мышей Af) трудно однозначно предсказать те или иные опухолевые эффекты лишайниковых субстанций. В первом эксперименте через 20 недель после окончания приема экстрактов *H. physodes* (в течение 28 сут.) выход легочных аденом не отличался от контроля, а *C. arbuscula* напротив повысила его почти вдвое (рис. 1).

В аналогичном эксперименте с экстрактами *R. pollinaria* и *E. prunastri* выход легочных аденом, хотя и статистически недостоверно, был заметно снижен – для *Ramalina* на 21 %, для *Evernia* на 45 % (рис. 1); видно, что испытуемые экстракты в этом плане не только не провоцируют спонтанный канцерогенез, но и оказывают определенное корректирующее действие. В результате при отсутствии контролируемого дополнительного воздействия канцерогена из 4 испытуемых видов лишайников лишь кладония показала не только отсутствие корректирующего эффекта, но и проканцерогенные свойства. И все же что-либо прогнозировать при дополнительном действии такого серьезного канцерогена, как уретан трудно и можно ожидать совершенно другие эффекты.

Во втором эксперименте введение уретана вызвало появление множественных аденом различной степени развития (рис. 2), экстракты не оказали какого-либо лечебно-профилактического



Рис. 1. Уровень спонтанных легочных аденом через 20 недель после окончания приема водных экстрактов *Hypogymnia physodes*, *Cladonia arbuscula*, *Ramalina pollinaria* и *Evernia prunastri* (в течение 28 сут.)

Fig. 1. The level of spontaneous pulmonary adenomas in 20 weeks after the end of intaking aqueous extracts of *Hypogymnia physodes*, *Cladonia arbuscula*, *Ramalina pollinaria* and *Evernia prunastri* (for 28 days)

эффекта, но значительно повлияли на выход уретан-индуцированных аденом. Тем не менее оценка опухолевых эффектов предполагает подсчет не только общего числа аденом, но и учета их размеров, соотношений и частоты случаев с тем или иным их выходом. Более подробный анализ мы разбили на несколько этапов: оценивали общий выход аденом, выход аденом от 1 мм, крупных (более 1 мм) и особо крупных (более 1,5 мм). Аденомы менее 1 мм чаще всего незаметны невооруженным взглядом, аденомы 1 мм хорошо различимы, а более крупные довольно легко отделяются пинцетом. Анализ общего числа аденом на мышь (А/М) по медиане показал проопухолевую тенденцию для *C. arbuscula*, как видно из табл. 1, а анализ числа аденом от 1 мм и выше показал таковую для *H. physodes*.

Тем не менее существенных различий между уретановыми группами выявить не удалось. При оценке опухолевых эффектов, помимо подсчета общего числа аденом на мышь, важен и учет соотношений аденом различного размера. Повышение количества аденом менее 1 мм может говорить о наличии условий, способствующих активизации канцерогенеза, в то время как повышение их доли может указывать на условия, препятствующие развитию мелких, труднозаметных аденом до более крупных (1–3,5 мм). Если аденомы менее 1 мм не представляют какой-либо угрозы, то более крупные нередко незаметны на поверхности долей легкого, так как врастают внутри них и сокращают их жизненную емкость. Дополнительно проведенный анализ соотношения между



Рис. 2. Вид легкого мыши с аденомами через 22 недели после введения уретана

Fig. 2. View of a mouse lung with adenomas in 22 weeks after urethane injection

Таблица 1. Выход уретан-индуцированных легочных аденом при пероральном поступлении водных экстрактов *Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula* в течение 28 суток

Table 1. Yield of urethane-induced pulmonary adenomas after oral intaking aqueous extracts of *Hypogymnia physodes* and *Cladonia arbuscula* for 28 days

Экспериментальная группа Experimental group	Σ		Аденома Adenoma					
			≥1 мм		>1 мм		>1,5 мм	
	$x \pm S_x$	<i>M</i>	$x \pm S_x$	<i>M</i>	$x \pm S_x$	<i>M</i>	$x \pm S_x$	<i>M</i>
Уретан (1 г/кг)	17,82 ± 5,62	18,00	11,00 ± 4,75	11,00	3,68 ± 2,08	3,00	1,23 ± 1,15	1,00
<i>Hypogymnia physodes</i> + уретан	20,97 ± 8,47	20,00	13,58 ± 5,69	14,00	5,06 ± 3,80	4,00	1,81 ± 2,18	1,00
<i>Cladonia arbuscula</i> + уретан	20,3 ± 18,16	21,50	12,03 ± 6,18	11,50	4,34 ± 2,97	4,00	1,34 ± 1,12	1,00

выходом аденом того или иного размера от их суммы в каждом образце не показал заметных различий по этому критерию (табл. 2), при этом доля аденом (менее 1 мм) на мышь во всех трех группах составила около 40 % (34–42 %).

Т а б л и ц а 2. Доля уретан-индуцированных аденом различного размера (%) от их суммы при пероральном поступлении водных экстрактов *Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula* в течение 28 суток

Table 2. The proportion of urethane-induced adenomas of various sizes (%) from their total after oral intaking aqueous extracts of *Hypogymnia physodes* and *Cladonia arbuscula* for 28 days

Экспериментальная группа Experimental group	Аденома Adenoma							
	<1 мм		1 мм		>1 мм		>1,5 мм	
	$x \pm S_x$	$M$	$x \pm S_x$	$M$	$x \pm S_x$	$M$	$x \pm S_x$	$M$
Уретан (1 г/кг)	39,54 ± 12,27	40,37	39,84 ± 10,37	37,50	20,61 ± 8,59	19,62	6,73 ± 5,56	5,72
<i>Hypogymnia physodes</i> + уретан	34,32 ± 15,97	36,36	41,90 ± 15,78	38,89	23,78 ± 14,73	21,88	8,20 ± 9,53	5,00
<i>Cladonia arbuscula</i> + уретан	41,50 ± 15,46	41,15	37,10 ± 12,52	39,35	21,40 ± 10,86	20,00	6,96 ± 5,85	6,56

Исходя из приведенных выше данных, был проведен анализ частоты случаев с тем или иным выходом аденом различного размера (степени зрелости). Распределение образцов в спектре частотности показало, что разбить/объединить случаи по критерию «аденом на мышь» наиболее затруднительно в его средней области, поэтому формирование интервалов легенды в диаграмме носит компромиссный характер между равномерным шагом и пиками/плато в каждой из трех уретановых групп. Тем не менее это позволило получить относительно ясную картину о характере действия экстрактов лишайников на выход аденом.

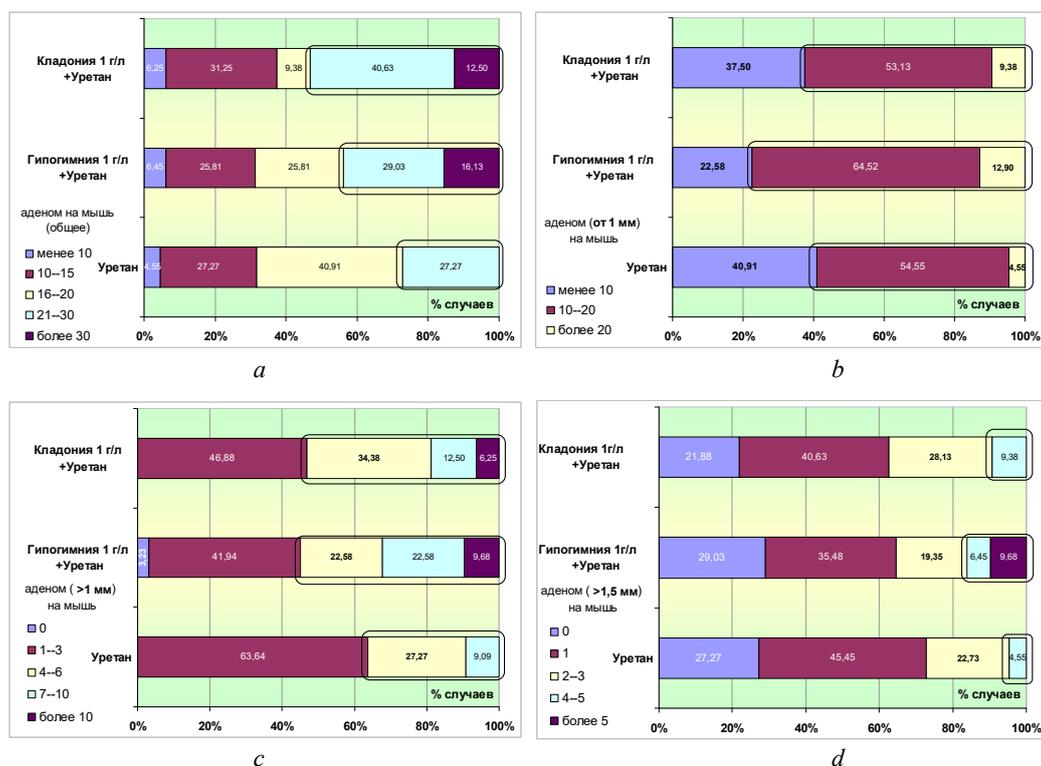


Рис. 3. Частота случаев с различным выходом уретан-индуцированных легочных аденом после перорального поступления водных экстрактов *Hypogymnia physodes* и *Cladonia arbuscula* в течение 28 суток: *a* – по общему числу аденом; *b* – по числу аденом от 1 мм; *c*, *d* – по числу крупных аденом

Fig. 3. The frequency of cases with different yields of urethane-induced pulmonary adenomas after oral intaking aqueous extracts of *Hypogymnia physodes* and *Cladonia arbuscula* for 28 days: *a* – by the total number of adenomas; *b* – by the number of adenomas from 1 mm; *c*, *d* – by the number of large adenomas

Рассмотрим частотность по общей сумме аденом. Первое, что сразу отличает группы «Гипогимния + уретан» и «Кладония + уретан» от «Уретан», это довольно высокая частота случаев  $A/M > 30$  при одновременном увеличении числа случаев  $A/M < 10$  (рис. 3, *a*).

Если при  $A/M 10–15$  группы между собой существенно не различаются, то уже при  $A/M 16–20$  вероятность таких случаев сильно падает в ряду «Уретан > Гипогимния + уретан (в 1,58 раза) > Кладония + уретан (в 4,36 раза)». Но это не является проявлением какого-либо лечебного эффекта, потому как возрастает частота случаев при  $A/M > 20$ . Отталкиваясь от того, что в группе «Уретан»  $A/M 21–30$  максимально и равно 27,27 %, суммация  $A/M 21–30$  и  $A/M > 30$  дает значения для «Гипогимния + уретан» 45,16 %, а для «Кладония + уретан» 53,13 %, что превышает эффект уретана в 1,66 и 1,95 раза соответственно.

Похожая картина складывается для «Гипогимния + уретан» при анализе частоты аденом от 1 мм. По сравнению с двумя другими группами в этом случае частота  $A/M 10–20$  возрастает на 10 %, а  $A/M > 20$  на 8 %: по отношению к группе «Уретан» это больше в 1,18 и 2,84 раза соответственно (рис. 3, *b*). При этом относительно группы «Уретан», в максимальной категории  $A/M > 20$ , как и на предыдущей диаграмме ( $A/M > 30$ ), для гипогимнии частота случаев выше, чем для кладонии. То же отмечено и при анализе частоты крупных ( $>1$  мм) аденом при  $A/M > 10$ , как видно на рис. 3, *c*. Причем при переходе от анализа частоты общего числа аденом к анализу частоты крупных аденом замечено, что возрастает пропорция в максимальной категории  $A/M$  между гипогимнией и кладонией – в 1,29, 1,38 и 1,55 раза соответственно (рис. 3, *a–c*).

Из рис. 3, *c* видно, что при  $A/M > 3$  между «Гипогимния + уретан» и «Кладония + уретан» по частотности крупных аденом различия незначительны, но в обоих случаях в 1,68–1,72 раза больше значений группы «Уретан». При  $A/M > 6$  эта разница увеличивается в ряду «Уретан > Кладония + уретан (в 2,06 раза) > Гипогимния + уретан (в 3,55 раза)».

И, наконец, анализ частоты случаев для аденом  $>1,5$  мм показывает, что, если при  $A/M 0$  и  $A/M 1$  различия между группами не столь ощутимы, то по сумме остальных категорий ( $A/M 2–3$  и далее) группы «Гипогимния + уретан» и «Кладония + уретан» превышают по данному показателю группу «Уретан» в 1,37 раза (рис. 3, *d*). При этом лишь в группе «Гипогимния + уретан» выделяется категория  $A/M > 5$ , и по сумме категорий ( $A/M 4–5$  и  $A/M > 5$ ) процент случаев в этой группе превышает таковой в группах «Кладония + уретан» и «Уретан» в 1,72 и 3,55 раза соответственно. Это еще раз убеждает в проканцерогенных свойствах *H. physodes* и *C. arbuscula*. Кроме того, для каждого из экстрактов отмечалось по 3 случая образования аденом  $>2$  мм, в т. ч. 2,5–3 мм. Таким образом, можно заключить, что оба испытуемых экстракта, модифицируя действие уретана, способны при пероральном поступлении (помимо отмеченной ранее гепатотоксичности) усиливать и опухолеобразование. При этом большей проканцерогенной активностью по выходу видимых аденом и по частоте случаев с высоким выходом аденом различного размера обладает *H. physodes*. Тем не менее выявленные эффекты имеют место лишь при методических условиях и целях данного эксперимента и не претендуют на универсальность.

В следующей серии экспериментов с уретаном были протестированы *R. pollinaria* и *E. prunastri*. Анализ суммарного числа аденом на мышь ( $A/M$ ), а также аденом от 1 мм по среднему и по медиане показал некоторую противоопухолевую тенденцию для *R. pollinaria* (для суммы аденом и для аденом от 1 мм), как видно из табл. 3. В противоположность этому по тем же пунктам *E. prunastri* демонстрировала обратный эффект. По количеству крупных аденом ( $>1$  мм и  $>1,5$  мм) существенных различий между группами не выявлено.

Тем не менее статистически значимых различий между всеми группами выявить не удалось. Дополнительный анализ доли аденом того или иного размера от их общей суммы также показал существенные различия по доле опухолей между *R. pollinaria* и другими уретановыми группами, как видно из табл. 4, а именно по выходу аденом  $<1$  мм (на 30–35 %). Доля аденом размером 1 мм и  $>1$  мм также была меньше в случае с *R. pollinaria*, но не столь заметной. По доле аденом размером  $>1,5$  мм различия между группами были еще менее заметны, но тенденция сохранялась та же.

В целом статистически значимых различий между группами по этому критерию также не было установлено, однако существенная разница между *R. pollinaria* и другими уретановыми

Т а б л и ц а 3. Выход уретан-индуцированных легочных аденом при пероральном поступлении водных экстрактов *Ramalina pollinaria* и *Evernia prunastri* в течение 28 суток

Table 3. Yield of urethane-induced pulmonary adenomas after oral intaking aqueous extracts of *Ramalina pollinaria* and *Evernia prunastri* for 28 days

Экспериментальная группа Experimental group	Σ		Аденома Adenoma					
			≥1 мм		>1 мм		>1,5 мм	
	$x \pm S_x$	M	$x \pm S_x$	M	$x \pm S_x$	M	$x \pm S_x$	M
Уретан (1 г/кг)	29,47 ± 9,11	31,00	18,41 ± 6,54	17,00	7,65 ± 3,94	7,00	2,12 ± 1,87	1,00
<i>Ramalina pollinaria</i> + уретан	27,28 ± 9,39	25,00	14,33 ± 6,47	12,50	6,00 ± 3,46	5,50	1,78 ± 1,93	2,00
<i>Evernia prunastri</i> + уретан	32,89 ± 11,42	36,00	20,83 ± 9,58	21,50	8,89 ± 5,93	6,00	2,61 ± 2,38	2,00

Т а б л и ц а 4. Доля уретан-индуцированных аденом различного размера от их суммы при пероральном поступлении водных экстрактов *Ramalina pollinaria* и *Evernia prunastri* в течение 28 суток

Table 4. The proportion of urethane-induced adenomas of various sizes from their total after oral intaking aqueous extracts of *Ramalina pollinaria* and *Evernia prunastri* for 28 days

Экспериментальная группа Experimental group	Аденома Adenoma							
	<1 мм		1 мм		>1 мм		>1,5 мм	
	$x \pm S_x$	M	$x \pm S_x$	M	$x \pm S_x$	M	$x \pm S_x$	M
Уретан (1 г/кг)	37,16 ± 11,60	33,33	37,07 ± 9,74	35,48	25,77 ± 9,36	25,00	6,86 ± 5,15	5,00
<i>Ramalina pollinaria</i> + уретан	48,18 ± 12,11	45,08	30,24 ± 6,82	30,77	21,58 ± 9,32	22,42	6,03 ± 6,28	5,13
<i>Evernia prunastri</i> + уретан	38,79 ± 12,15	38,26	35,62 ± 9,52	34,58	25,25 ± 10,25	25,54	7,36 ± 5,41	8,11

группами по доле аденом <1 мм в сочетании с пониженным числом аденом на мышь (суммарным, а также аденом от 1 мм) указывает на определенный противоопухолевый потенциал водных экстрактов *R. pollinaria*.

С учетом приведенных выше данных, как и для гипогимнии и кладонии, был проведен анализ частоты случаев с выходом аденом того или иного размера.

Рассмотрим частоту случаев по общей сумме аденом. При  $A/M < 10$  не зарегистрировано ни одного случая ни в одной из групп, при  $A/M 10-15$  и  $16-20$  в группах «Уретан» и «Рамалина + уретан» значения довольно невысоки и основная частота случаев приходится на  $A/M > 20$ . На их фоне резко выделяется группа «Эверния + уретан», прежде всего отсутствием случаев при  $A/M < 10$  и очень высокой частотой  $A/M > 30 - 61,11\%$  (рис. 4, а). В случае суммирования частоты случаев при  $A/M 21-30$  и  $A/M > 30$  в каждой из групп мышей между группами различия выражены довольно слабо (соответственно 88,23, 83,34 и 77,78 %). Тогда как при рассмотрении частоты при  $A/M > 30$  выделяется группа «Рамалина + уретан», в которой число таких случаев снижено на почти вдвое (в 1,91 раз), что указывает на явный противоопухолевый потенциал *R. pollinaria*. В то же время *E. prunastri*, как на фоне группы «Уретан», так и, в особенности, группы «Рамалина + уретан» демонстрирует обратный эффект и выступает как проканцероген.

Рассмотрим частоту случаев по аденомам от 1 мм. При  $A/M < 10$  в группе «Уретан» такой случай имел место, но не являлся характерным. Тогда как в группе «Рамалина + уретан» частота составила целых 27,78 %, и это существенно сдвинуло остальную часть спектра этой группы (рис. 4, б). Если при  $A/M > 20$  между этими группами различия не столь заметные, то при  $A/M 10-20$  в группе «Рамалина + уретан» частота снизилась на ~30 %, что в сочетании с вышеизложенным очередной раз указывает на ощутимый противоопухолевый потенциал. Что же касается группы «Эверния + уретан», то в ней категория  $A/M < 10$  отсутствует и, естественно, всю область гистограммы занимают категории  $A/M 10-20$  и  $A/M > 20$ . При  $A/M 10-20$  частота случаев сильно падает в ряду «Уретан > Рамалина + уретан (в 1,29 раза) > Эверния + уретан (в 2,37 раза)». Но для *E. prunastri* это не является проявлением какого-либо лечебного эффекта, потому как резко возрастает частота случаев при  $A/M > 20$ , а именно, превышает значения группы «Уретан» на 90 %.

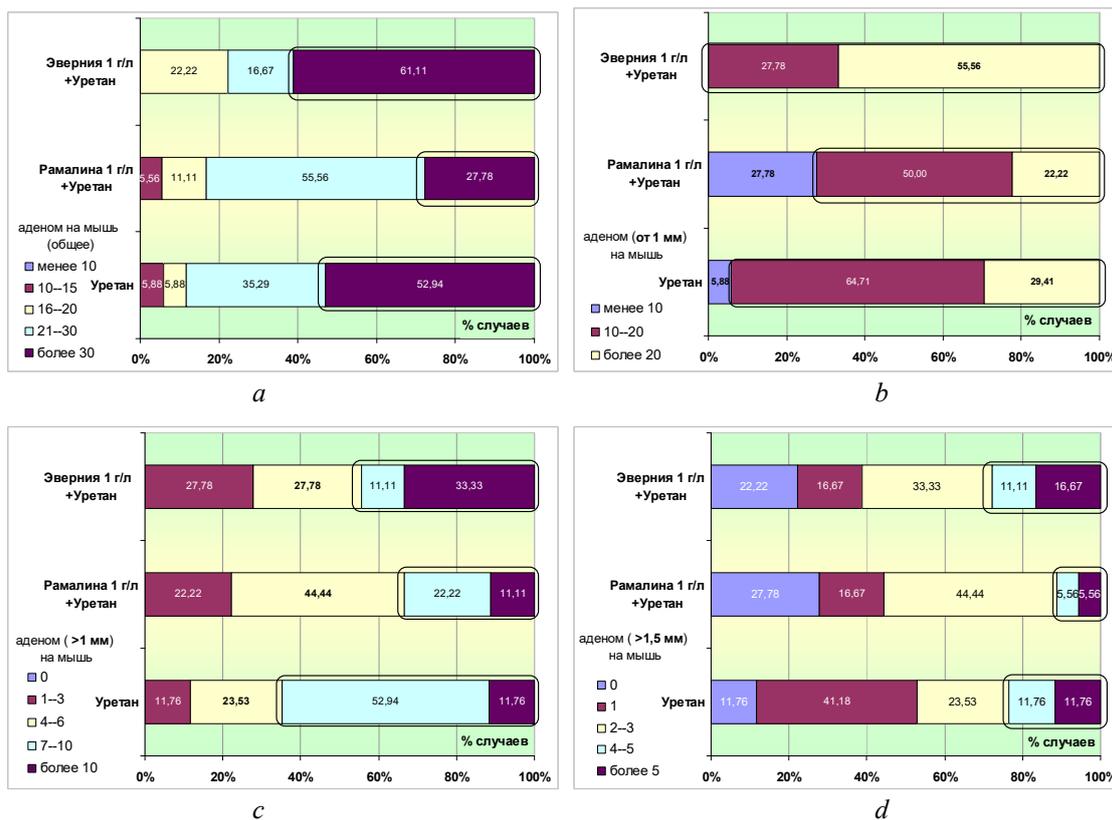


Рис. 4. Частота случаев с различным выходом уретан-индуцированных легочных аденом после перорального поступления водных экстрактов *Ramalina pollinaria* и *Evernia prunastri* в течение 28 суток: *a* – по общему числу аденом; *b* – по числу аденом от 1 мм; *c, d* – по числу крупных аденом

Fig. 4. The frequency of cases with different yields of urethane-induced pulmonary adenomas after oral intaking aqueous extracts of *Ramalina pollinaria* and *Evernia prunastri* for 28 days: *a* – by the total number of adenomas; *b* – by the number of adenomas from 1 mm; *c, d* – by the number of large adenomas

Рассмотрим частоту случаев по аденомам более 1 мм. При А/М 0 не зарегистрировано ни одного случая ни в одной из групп. Хорошо видно, что при А/М 1–3 частота случаев динамично возрастает в ряду «Уретан > Рамалина + уретан (в 1,29 раза) > Эверния + уретан» (в 2,37 раза). К тому же при А/М 7–10, сравнивая с группой «Уретан», в группах «Рамалина + уретан» и «Эверния + уретан» значения падают в 2,38 и 4,77 раза соответственно (рис. 4, *c*). Все это указывает на противоопухолевый потенциал обоих лишайников. Вместе с тем для *E. prunastri* при А/М > 10 наблюдается резкий скачок частоты случаев в 2,83 раза, в то время как для *R. pollinaria* изменений нет. В случае суммирования частоты случаев при А/М 7–10 и А/М > 10 в группах «Эверния + уретан» и «Рамалина + уретан» значения падают на 46 и 94 %. В таком ракурсе противоопухолевые потенциалы *E. prunastri* и *R. pollinaria* можно считать практически равноценными.

По ряду элементов схожая картина наблюдается при рассмотрении частоты случаев по аденомам более 1,5 мм (рис. 4, *d*). Случаи отсутствия таких аденом есть во всех группах, но более выраженное их повышение отмечено для *R. pollinaria* (в 1,89 раза) и *E. prunastri* (в 2,36 раза). При этом наряду с резким ростом случаев при А/М 0 резко снизилась частота случаев при А/М 1 (в 2,47 раза). Кроме того, в каждой из групп отмечено по 4 случая аденом > 2 мм. Если далее рассматривать частоты случаев при А/М 4–5 и А/М > 5, также их сумму, то разница между группой «Уретан» и «Эверния + уретан» уже довольно слабая – *E. prunastri* здесь не выступает как проканцероген. А вот *R. pollinaria* в том же ключе и здесь ярко проявилась – относительно группы «Уретан» показатели снизились в 2,12 раза.

Можно заключить, что оба испытуемых экстракта, будучи примерно в равной степени негепатотоксичными, при пероральном поступлении способны довольно противоположными способами модифицировать опухолевое действие уретана. При этом большей проканцерогенной ак-

тивностью по выходу аденом и по частоте случаев с высоким выходом аденом различного размера обладает *E. prunastri*. На протяжении всего вышеописанного анализа (рис. 4) можно заметить некоторую полярность касательно *E. prunastri*: наряду с заметным возрастанием частоты случаев (сравнивая с группой «Уретан») при низком А/М таковая резко возрастает при максимальном А/М. В случае с *R. pollinaria* возрастание частоты случаев при низком А/М выгодно дополняется резким снижением при максимальном А/М, но сопровождается расширением среднего участка гистограммы. Последнее можно интерпретировать по-разному, но, несомненно, на первый план почти всегда выходят крайние точки. По сути они и характеризуют наличие либо отсутствие того или иного эффекта. Поэтому будет справедливым считать, что определенный противоопухолевый потенциал у *E. prunastri* также имеется, и в наибольшей степени это видно при анализе спонтанных аденом.

**Заключение.** Таким образом, на моделях спонтанного и индуцированного канцерогенеза в легких у мышей после окончания перорального приема водных экстрактов лишайников в течение 28 сут. при отсутствии канцерогена из 4 видов только *C. arbuscula* показала проканцерогенные свойства, повысив среднее число легочных аденом на мышь почти вдвое. *R. pollinaria* и *E. prunastri* не только не провоцировали спонтанный канцерогенез, но и заметно уменьшали число аденом на мышь на 21–45 %.

Воздействие же канцерогена в процессе приема экстрактов впоследствии выявило проопухолевую тенденцию для *C. arbuscula* (по общему выходу аденом на мышь) и *H. physodes* (по выходу аденом от 1 мм и выше). Оба экстракта увеличивают частоту случаев с высоким выходом аденом различного размера; при этом заметно большую проканцерогенную активность по частоте случаев с высоким выходом аденом от 1 мм и более имеет *H. physodes*.

Анализ выхода уретановых аденом на мышь показал противоопухолевую тенденцию для *R. pollinaria* и проопухолевую – для *E. prunastri*. Значительное повышение частоты случаев с высоким выходом аденом различного размера в результате приема *E. prunastri* сопровождалось заметным возрастанием частоты случаев с низким выходом аденом. А в случае с *R. pollinaria* возрастание частоты случаев с низким выходом аденом выгодно дополнялось резким снижением частоты случаев с высоким выходом. В результате эксперимента *E. prunastri* проявила как проканцерогенную активность, так и противоопухолевые свойства, а *R. pollinaria* стабильно демонстрировала выраженный противоопухолевый потенциал.

### Список использованных источников

1. Ramya, K. Lichens: A myriad hue of Bioresources with medicinal properties / K. Ramya, Thiyagarajan T. // International Journal of Life Sciences. – 2017. – Vol. 5, N 3. – P. 387–393.
2. Rankovic, B. Lichen secondary metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential / B. Rankovic. – Springer International Publishing, 2015. – 206 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4>
3. Вавринчук, А. С. Рак кожи: факторы риска, эпидемиология в России и в мире / А. С. Вавринчук, А. Ю. Марочко // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 89.
4. Современные подходы к изучению канцерогенной безопасности, противоопухолевой, антиканцерогенной и геропротекторной активности фармакологических препаратов / В. Н. Анисимов [и др.] // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58, № 1. – С. 7–18.
5. On the Free Amino Acids in Lichens of Japan. II / F. Fujikawa [et al.] // Yakugaku Zasshi. – 1972. – Vol. 92, N 7. – P. 823–827. [https://doi.org/10.1248/yakushi1947.92.7\\_823](https://doi.org/10.1248/yakushi1947.92.7_823)
6. A new depsidone oxyphysodic acid isolated from a lichen parmelia enteromorpha ACH / T. Hirayama [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). – 1974. – Vol. 22, N 7. – P. 1678–1680. <https://doi.org/10.1248/cpb.22.1678>
7. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres / R. M. Ribeiro-Costa [et al.] // Journal of Microencapsulation. – 2004. – Vol. 21, N 4. – P. 371–384. <https://doi.org/10.1080/02652040410001673919>
8. Burton, J. F. Antileukemic activity of polyporic acid / J. F. Burton, B. F. Cain // Nature. – 1959. – Vol. 184, N 4695. – P. 1326–1327. <https://doi.org/10.1038/1841326a0>
9. Kupchan, S. M. L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens / S. M. Kupchan, H. L. Kopperman // Experientia. – 1975. – Vol. 31, N 6. – P. 625. <https://doi.org/10.1007/bf01944592>
10. Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products / T. Hirayama [et al.] // Yakugaku Zasshi. – 1980. – Vol. 100, N 7. – P. 755–759. [https://doi.org/10.1248/yakushi1947.100.7\\_755](https://doi.org/10.1248/yakushi1947.100.7_755)
11. Ambewelamides A and B, antineoplastic epidithiapiperazinediones isolated from the lichen *Usnea* sp. / D. E. Williams [et al.] // Tetrahedron Letters. – 1998. – Vol. 39, N 52. – P. 9579–9582. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(98\)02277-1](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(98)02277-1)

12. Structure revision and cytotoxic activity of the scabrosin esters, epidithiopiperazinediones from the lichen *Xanthoparmelia scabrosa* / M. A. Ernst-Russell [et al.] // *Australian Journal of Chemistry*. – 1999. – Vol. 52, N 4. – P. 279–283. <https://doi.org/10.1071/c99019>
13. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites / B. Rankovic [et al.] // *Medicinal Chemistry Research*. – 2014. – Vol. 23, N 1. – P. 408–416. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0644-y>
14. Kosanic, M. Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species / M. Kosanic, B. Rankovic, T. Stanojković // *Journal of Food Science*. – 2012. – Vol. 77, N 1. – P. 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02459.x>
15. Kosanic, M. M. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species / M. M. Kosanic, B. R. Rankovic, T. P. Stanojković // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2012. – Vol. 92, N 9. – P. 1909–1916. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5559>

## References

1. Ramya K., Thiagarajan T. Lichens: A myriad hue of Bioresources with medicinal properties. *International Journal of Life Sciences*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 387–393.
2. Rankovic B. Lichen secondary metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. Springer International Publishing, 2015. 206 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4>
3. Vavrinchuk A. S., Marochko A. Yu. Skin cancer: risk factors, epidemiology in Russia and in the world. *Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 6, pp. 89 (in Russian).
4. Anisimov V. N., Zabezhinsky M. A., Popovich I. G., Pliss G. B., Bespalov V. G., Aleksandrov V. A., Stukov A. N., Anikin I. V., Alimova I. N., Egormin P. A., Panchenko A. V., Piskunova T. S., Semenchenko A. V., Tyndyk M. L., Yurova M. N. Modern approaches to the study of carcinogenic safety, antitumor, anticarcinogenic and geroprotective activity of pharmacological drugs. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2012, vol. 58, no. 1, pp. 7–18 (in Russian).
5. Fujikawa F., Hirai K., Hirayama T., Toyota T., Urasaki M., Takagawa M., Fukuda M., Moritani K., Tomoike S., Harada H., Matoba C. On the Free Amino Acids in Lichens of Japan. II. *Yakugaku Zasshi*, 1972, vol. 92, no. 7, pp. 823–827. [https://doi.org/10.1248/yakushil947.92.7\\_823](https://doi.org/10.1248/yakushil947.92.7_823)
6. Hirayama T., Fujikawa F., Yosioka I., Kitagawa I. A new depsidone oxyphysodic acid isolated from a lichen *Parmelia enteromorpha* ACH. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1974, vol. 22, no. 7, pp. 1678–1680. <https://doi.org/10.1248/cpb.22.1678>
7. Ribeiro-Costa R. M., Alves A. J., Santos N. P., Nascimento S. C., Gonçalves E. C. P., Silva N. H., Honda N. K., Santos-Magalhães N. S. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 2004, vol. 21, no. 4, pp. 371–384. <https://doi.org/10.1080/02652040410001673919>
8. Burton J. F., Cain B. F. Antileukemic activity of polyporic acid. *Nature*, 1959, vol. 184, no. 4695, pp. 1326–1327. <https://doi.org/10.1038/1841326a0>
9. Kupchan S. M., Kopperman H. L. L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia*, 1975, vol. 31, no. 6, p. 625. <https://doi.org/10.1007/bf01944592>
10. Hirayama T., Fujikawa F., Kasahara T., Otsuka M., Nishida N., Mizuno D. Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. *Yakugaku Zasshi*, 1980, vol. 100, no. 7, pp. 755–759. [https://doi.org/10.1248/yakushil947.100.7\\_755](https://doi.org/10.1248/yakushil947.100.7_755)
11. Williams D. E., Bombuwala K., Lobkovsky E., De Silva E. D., Karunatne V., Allen T. M., Clardy J., Andersen R. J. Ambewelamides A and B, antineoplastic epidithiopiperazinediones isolated from the lichen *Usnea* sp. *Tetrahedron Letters*, 1998, vol. 39, no. 52, pp. 9579–9582. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(98\)02277-1](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(98)02277-1)
12. Ernst-Russell M. A., Elix J. A., Chai C. L. L., Hockless D. C. R., Hurne A. M., Waring P. Structure revision and cytotoxic activity of the scabrosin esters, epidithiopiperazinediones from the lichen *Xanthoparmelia scabrosa*. *Australian Journal of Chemistry*, 1999, vol. 52, no. 4, pp. 279–283. <https://doi.org/10.1071/c99019>
13. Rankovic B., Kosanic M., Manojlovic N., Rančić A., Stanojković T. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Medicinal Chemistry Research*, 2014, vol. 23, no. 1, pp. 408–416. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0644-y>
14. Kosanic M., Rankovic B., Stanojkovic T. Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species. *Journal of Food Science*, 2012, vol. 77, no. 1, pp. 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02459.x>
15. Kosanic M. M., Rankovic B. R., Stanojkovic T. P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, vol. 92, no. 9, pp. 1909–1916. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5559>

## Информация об авторах

Гончаров Сергей Васильевич – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: combinexpo@gmail.com.

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

Goncharov Sergey V. – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: combinexpo@gmail.com.

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