

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права
УДК 576.5:630*813.2:582.29

Матвеевков
Матвей Владимирович

**СКРИНИНГ *IN VITRO* ФОТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ
ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛЕСНЫХ ЛИШАЙНИКОВ БЕЛАРУСИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.01.01 – радиобиология

Минск 2024

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: Храмченкова Ольга Михайловна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биологии учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Официальные оппоненты: Стожаров Александр Николаевич, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры радиационной медицины и экологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Антоневич Наталья Георгиевна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунологии и вирусологии государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Защита состоится 2 мая 2024 года в 12⁰⁰ на заседании Совета по защите диссертаций К 01.36.01 при государственном научном учреждении «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 28; e-mail:khrustaleva.lir@gmail.com, тел./факс: 8 (017) 378-16-30.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии НАН Беларуси.

Автореферат разослан «29» марта 2024 года.

Ученый секретарь Совета
по защите диссертаций К 01.36.01
кандидат биологических наук, доцент



Т.А. Хрусталёва

ВВЕДЕНИЕ

Последствия вредного воздействия ультрафиолетового излучения на данный момент достаточно хорошо изучены. К наиболее значимым социальным и экономическим негативным эффектам избыточной инсоляции относят: меланомный, базальный и плоскоклеточный рак кожи, катаракту [Lucas R. et al., 2006]. А также: солнечные ожоги, фотостарение кожи, общую и локальную иммуносупрессию [Clydesdale G. J. et al., 2001; Rabe J. H. et al., 2006; Murphy G. M., 2009]. В отношении Республики Беларусь данная проблема актуальна по ряду причин. Наблюдается необратимое снижение уровня озона в атмосфере на территории Республики [Krasouski A. et al., 2019]. Как следствие, имеются данные о наличии высокого показателя ультрафиолетового индекса, достигающего значений в 6–7 единиц в весенне-летний период (май-июль), что отражает высокий потенциальный вред для здоровья населения [Krasouski A. et al., 2019]. В научной литературе также представлены данные, демонстрирующие рост злокачественных новообразований кожи у населения [Океанов А. Е. и др., 2020].

Существует множество запатентованных солнцезащитных веществ [Ma Y., 2021]. Их свойства обуславливаются изменением экзогенного (абсорбция излучения, высокая антиоксидантная емкость) и эндогенного (модуляция процессов воспаления, апоптоза, редокс систем и т.д.) воздействия ультрафиолетового излучения на клетки [Serpone N. et al., 2007; Bureš F., 2014; Yeager D. G. et al., 2019]. В настоящее время активно развивается исследование соединений и их комплексов, извлеченных 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 [Takshak S. B. et al., 2019].

Перспективным направлением в области поиска фотозащитных соединений является изучение выделенных из лишайников метаболитов. Известна способность данных организмов произрастать в условиях избыточной инсоляции, обусловленная преимущественно синтезом специфических соединений [Solhaug K. A. et al., 2003; Nybakken L. et al., 2004]. Изучение веществ из лишайников, в качестве модификаторов биологических эффектов излучения, демонстрирует снижение токсического действия ультрафиолета за счет их фотофизических и биологически активных свойств [Rancan F. et al., 2002; Ranković B. et al., 2015; Radice M. et al., 2016]. Тем не менее, слабо представлены в литературе данные о собственных цитотоксических свойствах лишайниковых веществ в отношении эпидермальных клеток человека. Отсутствуют работы, описывающие влияние на их фотомодифицирующие свойства условий экстрагирования, концентраций экстрактов, доз ультрафиолета. Все это ставит ряд актуальных проблем, решению которых может помочь широкий скрининг цитотоксических и фотомодифицирующих характеристик лишайниковых веществ и их комплексов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами

Диссертационная работа выполнена в рамках научно-исследовательских работ, проводимых в государственном научном учреждении «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси» и учреждении образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины». В рамках заданий 3.04 «Исследование фотопротекторной активности лишайниковых веществ» ГПНИ «Природопользование и экология» на 2016–2020 гг. №ГР 20160213 и 10.3.03.03 «Механизмы реализации, управление и коррекция жизнеспособности стабильных и опухолевых клеток человека при облучении ультрафиолетом с использованием экстрактов из лишайников» ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг. №ГР 20210254. А также в рамках научно-исследовательских работ по грантам Национальной академии наук Беларуси для аспирантов на 2021 год «Скрининг *in vitro* фотопротекторных свойств экстрактов из лесных лишайников Беларуси» №ГР 20212575 и на 2022 год «Скрининг фотомодифицирующих свойств экстрактов из лесных лишайников Беларуси в отношении опухолевой культуры клеток MCF-7» № ГР 20220954.

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190 на 2016–2020 гг. (№ 4 Медицина, фармация, медицинская техника (фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы); № 8 Рациональное природопользование и глубокая переработка природных ресурсов (устойчивое использование природных ресурсов и охрана окружающей среды)) и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 г. №156) №2 Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); управление здоровьем и средой обитания человека, его здоровое и безопасное питание, активное долголетие; №3 Энергетика, строительство, экология и рациональное природопользование: окружающая среда и климатология; атомная энергетика, ядерная и радиационная безопасность.

Цели и задачи исследования

Цель исследования: комплексная оценка фотозащитных свойств экстрактов из пяти распространенных в Беларуси видов лишайников в различных *in vitro* системах.

Для достижения поставленной цели были определены следующие основные задачи:

1. Оценить фотозащитные свойства экстрактов из пяти видов лишайников: определение SPF, $\lambda_{\text{крит}}$ и УФ-А/УФ-Б спиртовых растворов экстрактов;
2. Определить цитотоксичность экстрактов из лишайников в отношении культуры клеток кератиноцитов человека (HaCaT) и карциномы молочной железы (MCF-7);
3. Определить модификацию цитотоксичности ультрафиолетового излучения экстрактами из лишайников в отношении культуры клеток кератиноцитов человека (HaCaT) и карциномы молочной железы (MCF-7);
4. Оценить взаимосвязь цитотоксических и фотомодифицирующих эффектов экстрактов с условиями их получения и применения

Объект исследования: растворы экстрактов из лишайников, культуры кератиноцитов человека (HaCaT) и эпителиальной карциномы человека (MCF-7).

Предмет исследования: спектры поглощения ультрафиолетового излучения и основные фотозащитные показатели растворов экстрактов из лишайников, модификация фоточувствительности клеток кератиноцитов и эпителиальной карциномы человека экстрактами из лишайников, цитотоксичность экстрактов из лишайников в отношении клеток кератиноцитов и эпителиальной карциномы человека.

Научная новизна:

1. Впервые описаны фотозащитные свойства экстрактов из лишайников, произрастающих в Беларуси, по показателям, являющимся общепринятыми в *in vitro* оценке эффективности солнцезащитных составов;
2. Выделены группы экстрактов из лишайников, токсичных и нетоксичных в отношении культивируемых кератиноцитов человека;
3. Показаны фотозащитные и фотосенсибилизирующие свойства экстрактов из лишайников в отношении эпидермальных клеток человека, подвергшихся облучению ультрафиолетом средневолнового и длинноволнового диапазонов;
4. Показана способность экстрактов из лишайников снижать жизнеспособность клеток опухолевой эпидермоидной линии MCF-7 посредством собственной цитотоксичности и усиления повреждающего действия ультрафиолета;

5. Впервые в результате единообразного и широкого скрининга определены факторы, детерминирующие цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из лишайников, произрастающих в Беларуси.

Положения, выносимые на защиту:

1. Метанольный и этанольный экстракты из *Cladonia arbuscula* являются фотозащитными в области ультрафиолета Б и А. Ацетоновые, бензольные, метанольные, хлороформные, этанольные, этилацетатные экстракты из *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Ramalina pollinaria* обладают очень высоким уровнем фотозащиты в диапазоне 290÷320 нм.

2. Экстракты из лишайников модифицируют фоточувствительность кератиноцитов человека к ультрафиолету: значительная часть из них обладает фотопротекторными свойствами. Результаты исследования являются научным обоснованием возможности применения экстрактов из лишайников в качестве биологически активных добавок в солнцезащитных составах.

3. Экстракты из лишайников снижают жизнеспособность опухолевых эпителиальных клеток человека линии MCF-7 посредством цитотоксических и фотосенсибилизирующих эффектов. Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки методики управляемой коррекции жизнеспособности опухолевых клеток.

4. Различия в цитотоксическом действии экстрактов из лишайников в отношении эпидермальных клеток человека на 50,3 % обусловлены видом лишайника, из которого они получены. Цитотоксические свойства экстрактов в отношении опухолевых клеток на 38 % обусловлены растворителями, которыми экстрагировались лишайники. Модификация экстрактами эффектов облучения эпидермальных клеток человека связана с используемым для экстракции растворителем на 40,4 %, взятым для экстракции видом лишайников на 21,9 % и вносимой концентрацией экстракта на 11,4 %. Способность экстрактов усиливать фоточувствительность опухолевых клеток детерминирована экспериментальными факторами: взятым для экстракции видом лишайника на 29,4 %, используемым для экстракции растворителем на 34,2 %, вносимой концентрацией на 36,6 %. Выявленные детерминанты позволят получать экстракты с заданными свойствами.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором работы самостоятельно разработан дизайн и проведена серия экспериментов по изучению цитотоксических и фотомодифицирующих свойств экстрактов в отношении клеточных культур. Совместно с научным

руководителем выполнена постановка цели и задач исследования, сбор образцов пяти видов лишайников, получено 35 различных экстрактов, проведено предварительное исследование фотозащитных характеристик спиртовых растворов экстрактов. Благодаря методологическим консультациям сотрудника лаборатории биохимии и эндокринологии Института радиобиологии НАН Беларуси – Петренева Данилла Рудольфовича – соискателем освоен ряд методов работы с клеточными культурами. Анализ и интерпретация полученных результатов, их обобщение, а также вся статистическая обработка полученных данных исследования и написание текста диссертации выполнены автором самостоятельно.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях, семинарах и съездах: международной научно-практической конференции «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (г. Гомель, 26-27 апреля 2018 г.), «Радиобиология: актуальные проблемы» (г. Гомель, 27-28 сентября 2018 г.), «Состояние и перспективы разработки, использования биологически активных соединений в научной и практической деятельности» (г. Брест, 4-5 октября 2018 г.), «Дни студенческой науки» (г. Гомель, 15-16 мая 2018 г.), «Радиобиология: Современные проблемы» (г. Гомель, 26-27 сентября 2019 г.), «Молодежь в науке – 2019» (г. Минск, 14-17 октября 2019 г.), 15th International conference on Healthcare ICNC2019 (Barcelona, may 27-29, 2019), «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (г. Гомель, 19 июня 2020 г.), «Радиобиология: современные проблемы 2020» (г. Гомель, 24-25 сентября 2020 г.), «Современные проблемы радиобиологии – 2021» (г. Гомель, 23-24 сентября 2021 г.), «Молодежь в науке – 2021» (г. Минск, 27-30 сентября 2021 г.), «XXIV Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (г. Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 г.), «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике» (г. Гомель, 29 апреля 2021 г.), «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (г. Гомель, 5-6 мая 2022 г.), «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (г. Минск, 21 мая 2021 г.), «Радиобиология и экологическая безопасность – 2022» (г. Гомель, 26-27 мая 2022 г.).

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 31 работа. Из них 11 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих части первой

пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (8,78 авторского листа, процент соавторства – 50,73 %), 16 – материалы конференций, 4 – тезисы докладов конференций. Общее количество опубликованных материалов составляет 11,79 авторского листа. Средний процент соавторства – 74,78 %.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследования (глава 2), результатов собственных исследований, изложенных в главах 3–5, заключения, библиографического списка (290 источников, из них 30 – на русском языке, 260 – на иностранных языках), собственных публикаций соискателя – 32. Диссертационная работа содержит 24 рисунка, 16 таблиц, 6 формул, 17 приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Получение экстрактов лишайников. Биомассу лишайников *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. отбирали в пригородных лесах г. Гомель на типичных для каждого вида субстратах. Талломы высушивали до воздушно-сухого состояния, измельчали. Навески измельченной биомассы экстрагировали ацетоном, бензолом, гексаном, метанолом, хлороформом, этанолом и этилацетатом в аппарате Сокслета. Растворитель удаляли с помощью ротационного испарителя. Полученные сухие экстракты хранили в сухом темном месте при комнатной температуре.

Подготовка клеточных линий. Использовали культуру стабильных кератиноцитов человека (HaCaT) и опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Культуры были получены в НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Режим культивирования стандартный: 37 °С, 90 % влажности воздуха с 5 % содержанием CO₂, коэффициент субкультивирования 1/5. Состав среды: DMEM/F-12; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин-В; 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки.

Инкубация клеток с экстрактами. Культуру клеток преинкубировали в 96-и луночных планшетах до достижения фазы экспоненциального роста. Затем вносили в лунки планшета раствор сухого экстракта в диметилсульфоксиде

(ДМСО), серийно разведенный в питательной среде, в диапазоне концентраций 200–0,78 мкг/мл. Наивысшая концентрация ДМСО составила не более 1 % от объема инкубационной среды. По прошествии 48 ч. оценивали жизнеспособность клеток по методу, описанному ниже.

Для определения модификации фототоксических эффектов, после периода преинкубации в планшете культуру клеток пошагово экспонировали в каждом ряду лунок планшета заданное время на поверхности стеклянного УФ-фильтра системы гель-документации Chemidoc (Biorad), предварительно добавив в питательную среду растворы экстрактов лишайников в концентрациях 2,5; 5,0 и 10,0 мкг/мл. Энергетический максимум излучения 315 нм, расчетная интегральная (280–450 нм) мощность светового потока 1446 мкВт/см². Доля УФ-Б – 40% от всего УФ диапазона, мощность светового потока после прохождения через пластик для УФ-Б (280–315 нм) составила 464 мкВт/см², для УФ-А (315–400 нм) – 689 мкВт/см².

Жизнеспособность клеточных популяций в эксперименте определяли с помощью МТТ-теста, измеряющего метаболическую активность клеток – тест на скорость восстановления 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, M5655, Sigma).

Анализ выживаемости клеток в экспериментальных условиях проводили с помощью аппроксимации полученных зависимостей «доза-эффект» или «концентрация-эффект» уравнением Хилла с переменным коэффициентом наклона. Для статистической проверки гипотез о различии действия отдельных экстрактов, сравнивали параметры экспериментальных кривых выживаемости клеток сопоставлением регрессионных моделей на вложенность методом F-теста. Анализ результатов исследования производили с помощью программных продуктов Graph Pad Prism (Version 8.01) и Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Выход экстрактов из лишайников существенно отличался (таблица 1). Химический выход экстрактов был наименьшим в случае использования гексана в качестве экстрагента, наибольший – при использовании метанола.

Таблица 1 – Химический выход экстрактов из лишайников

В процентах воздушно-сухой массы лишайника

Вид лишайника	Используемый экстрагент						
	ацетон	бензол	гексан	метанол	хлороформ	этанол	этилацетат
<i>C. arbuscula</i>	3,7±0,21	1,3±0,29	1,6±0,29	8,6±1,42	3,1±0,47	1,7±0,28	3,2±0,53
<i>E. prunastri</i>	11,5±0,57	5,8±0,51	1,9±0,17	16,4±1,46	9,8±1,49	10,1±1,88	8,9±1,18
<i>H. physodes</i>	12,8±0,49	5,4±0,46	1,8±0,22	15,7±1,05	10,8±1,34	15,1±1,31	12,6±1,22
<i>R. pollinaria</i>	11,3±0,56	5,4±0,49	1,6±0,37	17,9±1,39	7,4±0,87	12,2±1,75	10,2±1,22
<i>X. parietina</i>	4,5±0,95	2,5±0,32	2,0±0,42	11,6±1,64	3,9±0,37	3,8±0,95	3,3±0,66

Все полученные экстракты из лишайников обладали свойством фотозащиты – таблица 2.

Таблица 2 – Величины SPF экстрактов из лишайников

Используемый экстрагент	Вид лишайника				
	<i>C. arbuscula</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>R. pollinaria</i>	<i>X. parietina</i>
Ацетон	7,1 ± 0,46	34,71 ± 2,18	25,4 ± 1,86	36,5 ± 1,91	5,9 ± 0,76
Бензол	5,1 ± 0,75	40,8 ± 2,34	15,6 ± 0,99	40,7 ± 2,31	5,3 ± 0,69
Гексан	6,9 ± 0,31	13,7 ± 0,98	7,1 ± 0,42	10,9 ± 0,87	3,8 ± 0,47
Метанол	22,4 ± 1,75	36,3 ± 2,02	23,7 ± 2,13	32,9 ± 1,74	4,2 ± 0,87
Хлороформ	7,2 ± 0,74	39,6 ± 2,05	21,9 ± 1,84	39,9 ± 2,11	4,6 ± 0,87
Этанол	15,1 ± 0,22	34,4 ± 1,02	18,1 ± 0,74	37,3 ± 0,98	5,5 ± 0,31
Этилацетат	9,4 ± 0,97	40,4 ± 2,18	22,4 ± 1,82	39,5 ± 1,83	4,5 ± 0,76

Низким уровнем фотозащиты характеризовались все экстракты из *Xanthoria parietina*; ацетоновый, гексановый, бензольный и хлороформный экстракты из *Cladonia arbuscula*, а также гексановый экстракт из *Hypogymnia physodes*. Средний уровень SPF установлен для гексановых экстрактов из *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria*, а также для метанольного экстракта из *Cladonia arbuscula*. Высокой фотозащитной активностью отличались все (кроме гексанового) экстракты из *Hypogymnia physodes* а также этанольный и метанольный экстракты из *Cladonia arbuscula*. Очень высокий уровень фотозащиты был присущ всем экстрактам (кроме гексановых) из *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria*.

В таблице 3 приведены результаты определения $\lambda_{\text{крит}}$ анализируемых экстрактов из лишайников.

Таблица 3 – Величины критической длины волны экстрактов из лишайников

В нанометрах

Используемый экстрагент	Вид лишайника				
	<i>C. arbuscula</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>R. pollinaria</i>	<i>X. parietina</i>
Ацетон	371 ± 5,2	337 ± 6,9	346 ± 8,3	327 ± 6,5	389 ± 9,2
Бензол	373 ± 7,2	358 ± 2,8	358 ± 4,6	337 ± 6,1	392 ± 5,7
Гексан	375 ± 4,4	373 ± 3,9	366 ± 5,6	366 ± 3,9	392 ± 8,4
Метанол	373 ± 2,8	367 ± 4,9	364 ± 7,2	354 ± 5,8	382 ± 9,5
Хлороформ	368 ± 4,39	344 ± 5,25	346 ± 3,49	330 ± 9,21	385 ± 7,18
Этанол	372 ± 1,71	341 ± 4,8	361 ± 3,7	339 ± 2,3	392 ± 3,1
Этилацетат	372 ± 5,01	351 ± 5,39	347 ± 7,86	328 ± 8,49	376 ± 6,94

По показателям величин $\lambda_{\text{крит}}$ и SPF солнцезащитным является метанольный и этанольный экстракты из *Cladonia arbuscula*. Гексановый экстракт из *Evernia prunastri* по своим свойствам приближается к фотозащитным. Экстракты из лишайников с высокими значениями SPF и балльностью $\lambda_{\text{крит}} = 0 \div 2$ могут быть рекомендованы в составы средств для загара в качестве агентов, защищающих от действия УФ-Б.

В таблице 4 приведены результаты расчета УФ-А/УФ-Б анализируемых экстрактов из лишайников.

Таблица 4 – Величины отношения УФ-А/УФ-Б экстрактов из лишайников

Используемый экстрагент	Вид лишайника				
	<i>C. arbuscula</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>R. pollinaria</i>	<i>X. parietina</i>
Ацетон	0,92 ± 0,075	0,29 ± 0,018	0,36 ± 0,045	0,20 ± 0,009	1,56 ± 0,186
Бензол	0,91 ± 0,082	0,64 ± 0,057	0,82 ± 0,079	0,31 ± 0,023	1,93 ± 0,234
Гексан	0,98 ± 0,093	0,88 ± 0,061	0,91 ± 0,098	0,75 ± 0,061	1,77 ± 0,129
Метанол	0,81 ± 0,056	0,52 ± 0,034	1,01 ± 0,079	0,38 ± 0,018	0,99 ± 0,095
Хлороформ	0,93 ± 0,094	0,34 ± 0,054	0,65 ± 0,073	0,24 ± 0,044	1,11 ± 0,086
Этанол	0,89 ± 0,069	0,34 ± 0,029	0,77 ± 0,056	0,31 ± 0,014	1,35 ± 0,146
Этилацетат	1,02 ± 0,081	0,39 ± 0,058	0,63 ± 0,069	0,21 ± 0,039	0,86 ± 0,074

Для экстрактов из *H. physodes* установлен высокий уровень фотозащиты; для экстрактов из *E. prunastri* и *R. pollinaria* – очень высокий; для *X. parietina* – низкий; для *C. arbuscula* – низкий, средний и высокий.

Оценено цитотоксическое действие 35 экстрактов в отношении кератиноцитов человека (таблица 5).

Таблица 5 – Различные аналитические величины цитотоксического эффекта экстрактов из лишайников в отношении клеток HaCaT, оцененные с помощью МТТ-теста после 48 часов инкубации

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

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

Сравнение IC_{50} экстрактов с критериальным значением ($IC_{50} < 30$ мкг/мл), рекомендованным Национальным институтом рака США (NCI), 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.

Методом множественной регрессии проведена оценка силы влияния экспериментальных факторов на цитотоксическую активность экстрактов. Таким образом, получение экстрактов из различных видов лишайников определяло 50,3 % ($R^2 = 0,503$; при $p = 0,0002$) вариации показателя. Извлечение веществ различными растворителями существенно не влияет на цитотоксические свойства экстрактов ($R^2 = 0,21$; при $p = 0,3148$).

Оценена способность тридцати пяти экстрактов подавлять жизнеспособность опухолевой линии клеток эпителиального происхождения MCF-7 (таблица 6).

Таблица 6 – Различные аналитические величины цитотоксического эффекта экстрактов из лишайников в отношении опухолевых клеток MCF-7, оцененные с помощью МТТ-теста после 48 часов инкубации

Экстракты		IC_{10} , мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл	IC_{90} , мкг/мл
<i>Cladonia arbuscula</i>	ацетон	<1,00	4,18±0,46	5,89
	бензол	<1,00	54,35±7,28	155,30

Продолжение таблицы 6

	гексан	7,24	24,46±1,57	79,47
	метанол	6,89	46,92±8,20	>200
	хлороформ	1,66	9,50±0,63	>200
	этанол	<1,00	59,67±12,45	45,04
	этилацетат	2,75	14,81±1,11	>200
<i>Evernia prunastri</i>	ацетон	<1	5,62±1,08	11,71
	бензол	<1	51,36±3,73	93,74
	гексан	14,26	29,71±1,97	59,88
	метанол	25,39	102,40±46,99	>200
	хлороформ	7,2	45,07±8,97	92,34
	этанол	<1	64,13±8,23	>200
	этилацетат	22,86	57,72±4,80	87,68
<i>Hypogimnia physodes</i>	ацетон	1,97	4,08±0,79	5,67
	бензол	<1	37,55±3,73	99,20
	гексан	17,47	35,08±2,66	68,36
	метанол	33,79	70,84±4,40	136,3
	хлороформ	9,093	32,77±3,55	121,00
	этанол	4,67	7,07±0,34	8,37
	этилацетат	9,019	36,60±3,53	150,30
<i>Ramalina pollinaria</i>	ацетон	21,89	49,92±4,15	77,14
	бензол	1,12	34,19±3,433	91,47
	гексан	17,29	37,64±2,72	79,78
	метанол	36,01	71,97±8,44	136,40
	хлороформ	<1	10,40±1,096	29,85
	этанол	11,44	58,46±6,48	156,20
	этилацетат	<1	45,96±8,041	117,10
<i>Xanthoria parietina</i>	ацетон	49,04	102,20±9,35	>200
	бензол	5,31	30,66±4,62	>200
	гексан	22,58	69,95±8,44	>200
	метанол	19,41	108,60±26,29	>200
	хлороформ	<1	14,21±2,96	80,79
	этанол	23,85	81,98±9,95	>200
	этилацетат	<1	20,05±2,96	55,67

К токсичным относятся следующие экстракты: ацетоновый, гексановый, хлороформный, этилацетатный из вида *Cladonia arbuscula*; ацетоновый и гексановый из *Evernia prunastri*; ацетоновый и этанольный экстракт из *Hypogimnia physodes*; хлороформный из вида *Ramalina pollinaria*; хлороформный и этилацетатный из *Xanthoria parietina*.

На основании результатов множественной регрессии взятые для экстракции лишайников растворители обуславливали 38 % ($R^2 = 0,38$; при $p = 0,0268$) вариации количественного показателя. Видовая принадлежность лишайника, взятого для получения экстракта, достоверно не влияет на изменение их цитотоксических свойств ($R^2 = 0,17$; при $p = 0,22$).

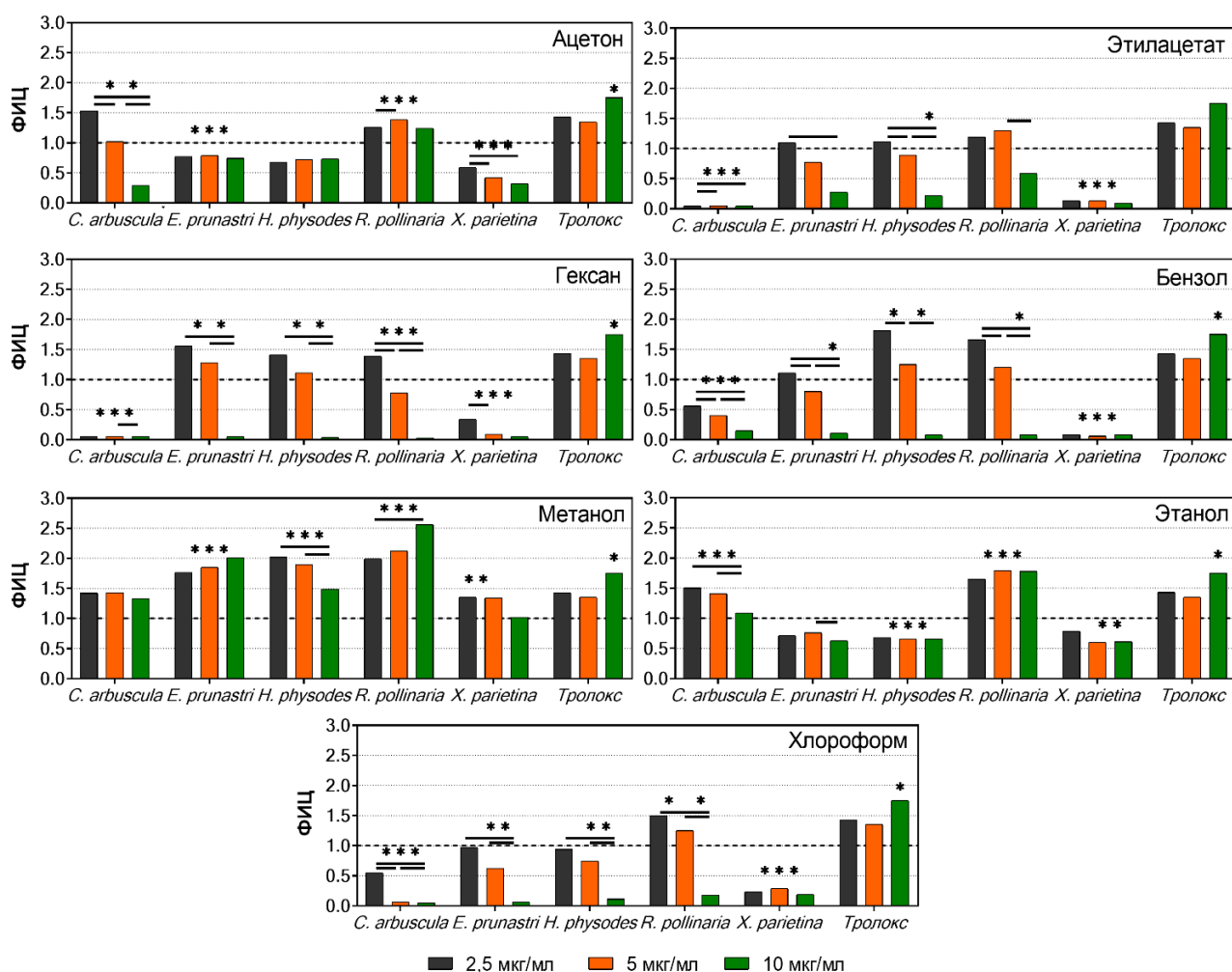
В отношении клеток кератиноцитов, исследуемые экстракты по-разному модифицировали эффект облучения ультрафиолетом. Анализ величины ФИЦ:

$$\text{ФИЦ} = \frac{ID_{50}(\text{опыт})}{ID_{50}(\text{контроль})}, \quad (1)$$

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,

позволил разделить экстракты на фотопротекторные и фотосенсибилизирующие (рисунок 1).



Примечание – Знаком (*) отмечены величины факторов, полученные при соотношении достоверно различающегося параметра (ID_{50}) контрольной и опытной кривых выживаемости клеток при $p < 0,05$. Линиями соединены величины факторов, достоверно различающихся по аналогичному критерию и полученные при изменении концентрации экстракта.

Рисунок 1 – Величины модификации цитотоксического действия ультрафиолета экстрактами из лишайников и Тролоксом в отношении эпидермальных клеток человека HaCaT

К экстрактам, обладающим фотопротекторным действием в отношении кератиноцитов человека, можно отнести: этанольные экстракты из *Cladonia arbuscula* и *Ramalina pollinaria*; ацетоновый из *Ramalina pollinaria*; а также метанольные из *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Полученные при перечисленных условиях 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. Зачастую защитное действие перечисленных экстрактов количественно превосходит таковое у модельного вещества – антиоксиданта Тролокса.

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*; бензольный из *Ramalina pollinaria*; 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 раза. 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.

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* (ацетоновый), *Evernia prunastri* (гексановый), *Hypogimnia physodes* (бензольный, гексановый), *Ramalina pollinaria* (гексановый и хлороформный). Количественные эффекты модификации имеют определенную концентрационную зависимость. Добавление экстрактов в концентрации 2,5 мкг/мл снижает токсическое действие излучения в 1,50–1,61 раза. Увеличение концентрации в два раза снижает выживаемость кератиноцитов в условиях облучения до контрольного уровня. Дальнейшее увеличение содержания экстракта в питательной среде приводит к выраженным эффектам сенсibilизации, увеличивая чувствительность кератиноцитов к ультрафиолету в 6,56–26,39 раза.

Анализировали влияние перечисленных экспериментальных факторов на фотомодификационные свойства экстрактов. Извлечение веществ различными растворителями, обуславливает 40,4 % ($R^2 = 0,404$; $p = 0,0001$) вариации полудозы ультрафиолета. Вещества, извлеченные метанолом,

в среднем увеличивает полулетальную дозу ультрафиолета для клеток на 2,70 мДж/см² (p = 0,0005). Использование гексановых, хлороформных и этилацетатных экстрактов достоверно снижает дозу половинного ингибирования на 1,7–1,8 мДж/см². Меньшим влиянием на свойства модификации облучения экстрактами обладают такие факторы как «вид» и «концентрация», обуславливая 21,9 и 11,4 % вариации полулетальной дозы соответственно (R² = 0,219 и 0,114; p = 0,0001 и 0,0036). Экстракты из *Xanthoria parietina*, увеличивают чувствительность клеток к облучению в среднем на 2,19 мДж/см² (p = 0,0074). Внесение в питательную среду экстрактов в количестве 10 мкг/мл также увеличивает их сенсibilизационные свойства на 1,74 мДж/см² (p = 0,030).

Оценивали способность экстрактов усиливать повреждающее действие ультрафиолета на опухолевые клетки через фактор фотосенсibilизации:

$$\Phi\Phi = \frac{ID_{50}(\text{контроль})}{ID_{50}(\text{опыт})} \quad (2)$$

где ID₅₀ (опыт) – величина полулетальной дозы облучения клеток при добавлении в питательную среду экстрактов лишайников;

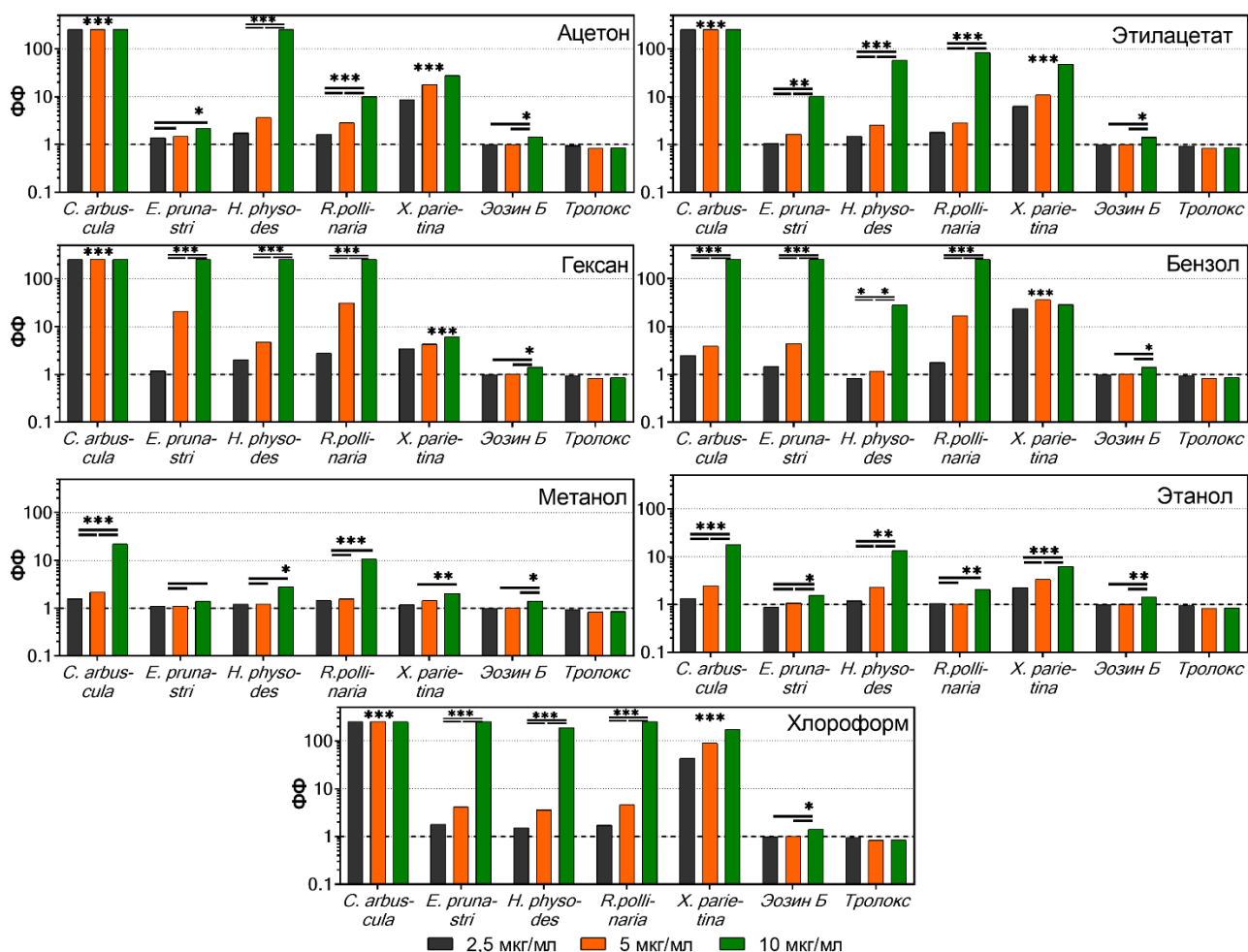
ID₅₀ (контроль) – то же, без добавления экстрактов лишайников.

Аналитические величины представлены на рисунке 2. Некоторые экстракты проявили способность полностью подавлять жизнеспособность клеток при облучении их самыми малыми дозами ультрафиолета. В данном случае сложно оценить реальную полулетальную дозу излучения для опытной группы, поэтому она принималась за теоретически минимальную – 0,02 мДж/см².

Наиболее слабым сенсibilизирующим действием обладали экстракты, выделенные из биомассы лишайника при помощи метанола и этанола. В основном их фотосенсibilизационные свойства проявляются в концентрации от 5 мкг/мл. Минимальный эффект у метанольного экстракта из *Ramalina pollinaria* в концентрации 5 мкг/мл (ΦΦ = 1,56), максимальный – у метанольного из *Cladonia arbuscula* в концентрации 10 мкг/мл (ΦΦ = 22,31).

Наиболее выраженное усиление фоточувствительности клеток проявила следующая группа экстрактов: ацетоновые, этилацетатные, гексановые, бензольные и хлороформные, выделенные из пяти исследуемых видов лишайников. Для экстрактов, выделенных из видов *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, характерно концентрационно-зависимое увеличение их фотосенсibilизирующих свойств. В концентрации 2,5 мкг/мл наблюдается усиление действия ультрафиолета до 2,83 раза – гексановый из *Ramalina pollinaria*. В концентрации 5 мкг/мл усиливается летальное действие излучения вплоть до 31,17 раза – гексановый из *Ramalina*

pollinaria. Дальнейшее увеличение концентрации перечисленных экстрактов способствует усилению повреждающих свойств ультрафиолетового излучения от 2,15 (ацетоновый из *Evernia prunastri*) до 254,31 раза (гексановый и ацетоновый из *Hypogymnia physodes*; гексановые, бензольные и хлороформные из *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria*).



Примечание – Знаком (*) отмечены величины факторов, полученные при соотношении достоверно различающегося параметра (ID_{50}) контрольной и опытной кривых выживаемости клеток при $p < 0,05$. Линиями соединены величины факторов, достоверно различающихся по аналогичному критерию и полученные при изменении концентрации экстракта.

Рисунок 2 – Величины фотосенсибилизации цитотоксического действия ультрафиолета экстрактами из лишайников, Эозином Б и Тролоксом в отношении опухолевых клеток MCF-7

Другой характер фотосенсибилизации проявили экстракты из *Cladonia arbuscula* и *Xanthoria parietina*. Первые способны, независимо от концентрации, полностью подавлять жизнеспособность клеток при их облучении в самых малых дозах ультрафиолетового излучения. Экстракты из *Xanthoria*

parietina обладают менее выраженными, но достаточно сильными фотосенсибилизирующими свойствами, усиливая действие излучения на клетки в 3,5–172,5 раза, при этом наблюдаемый эффект также не зависит от применяемых концентраций.

Хочется отметить, что почти все экстракты оказывали более сильный фотосенсибилизирующий эффект в сравнении с модельным сенсибилизатором Эозином Б. Примечательно также отсутствие фотозащитного эффекта у Тролокса, в отношении принятой к исследованию опухолевой линии клеток.

По результатам множественной регрессии, фотосенсибилизирующие свойства экстрактов почти в равной степени зависят от вида лишайника (29,4 %; $R = 0,294$), применяемого растворителя (34,2 %; $R = 0,342$) и вносимой концентрации (36,6 %; $R = 0,366$), при $p < 0,0001$. Анализ показателей бета-коэффициентов регрессии позволил составить следующий ряд убывания фотосенсибилизирующих свойств различных экстрактов, в мДж/см²: хлороформные (-4,87) > гексановые (-4,84) > этилацетатные (-4,34) > ацетоновые (-4,32) > бензольные (-4,15) > этанольные (-2,52) > метанольные (-2,31). Аналогичный ряд составлен для используемых для экстракции видов лишайников: *Cladonia arbuscula* (-5,04) > *Xanthoria parietina* (-4,71) > *Ramalina pollinaria* (-3,75) > *Hypogymnia physodes* (-3,35) > *Evernia prunastri* (-2,70). Увеличение концентрации, в среднем, снижает полулетальную дозу для клеток, при использовании всех экстрактов на: -2,65, -3,84, -5,18 мДж/см² – для 2,5, 5 и 10 мкг/мл соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Показана возможность экстракции из лишайниковой биомассы комплексов фотозащитных соединений, не оказывающих токсического и фотосенсибилизирующего действия в отношении клеток кожи человека ($IC_{50} > 30$ мкг/мл). Метанольный из *Cladonia arbuscula* демонстрирует высокие фотопогложительные свойства в отношении средневолнового и длинноволнового спектров ультрафиолета ($SPF = 22,40$; $370 \text{ нм} < \lambda_{\text{крит}}$ соответственно). Данное извлечение может быть рекомендовано в качестве основного компонента солнцезащитных составов. Ацетоновый, метанольный, хлороформный и этанольный экстракты из *Ramalina pollinaria*; бензольный и метанольный из *Hypogymnia physodes*; метанольный из *Evernia prunastri* – обладают высокой поглотительной способностью в области ультрафиолета Б ($SPF = 15,6–40,8$), и могут использоваться в качестве добавок к солнцезащитным составам [1-8–А, 13-16–А].

2. Предлучевая обработка кератиноцитов человека экстрактами из лишайников позволяет модифицировать токсические эффекты облучения в градиенте доз ультрафиолета. Фотозащитными свойствами, выраженными в снижении фоточувствительности клеток (ФИЦ = 1,34–2,62; при $p < 0,05$), обладают экстракты: этанольный из *Cladonia arbuscula*, этанольный и ацетоновый из *Ramalina pollinaria*, а также метанольные из видов *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Выявлены экстракты, способные усиливать фоточувствительность клеток кератиноцитов: бензольный, гексановый, хлороформный и этилацетатный из *Cladonia arbuscula*; ацетоновый, бензольный, хлороформный и этилацетатный из *Evernia prunastri*; бензольный из *Ramalina pollinaria*; ацетоновый, хлороформный, этанольный и этилацетатный из *Hypogymnia physodes*; а также все экстракты из *Xanthoria parietina* кроме метанольного (ФИЦ = 0,037–0,74 или ФИЦ $< 0,01$; при $p < 0,05$). Выделена группа модификаторов облучения: ацетоновый из *Cladonia arbuscula*, гексановый из *Evernia prunastri*, бензольный и гексановый из *Hypogymnia physodes*, гексановый и хлороформный из *Ramalina pollinaria*, показавшие способность снижать в концентрации 2,5 мкг/мл (ФИЦ = 1,50–1,61; при $p < 0,05$) и усиливать в концентрации 10 мкг/мл (ФИЦ = 0,037–0,15; при $p < 0,05$) фоточувствительность кератиноцитов. Результаты исследования являются научным обоснованием возможности применения экстрактов из лишайников в качестве биологически активных добавок в солнцезащитных составах [3–А, 5–7–А, 9–А, 17–24–А, 30–А, 31–А].

3. Экстракты из лишайников способны снижать жизнеспособность опухолевых эпителиальных клеток человека линии MCF-7 посредством цитотоксических и фотосенсибилизирующих эффектов. Цитотоксическими свойствами ($IC_{50} < 30$ мкг/мл) в отношении опухолевых клеток обладают экстракты: ацетоновый, гексановый, хлороформный, этилацетатный из вида *Cladonia arbuscula*; ацетоновый и гексановый из *Evernia prunastri*; ацетоновый и этанольный экстракт из *Hypogymnia physodes*; хлороформный из вида *Ramalina pollinaria*; хлороформный и этилацетатный из *Xanthoria parietina*. Метанольные и этанольные экстракты всех видов проявили относительно слабые фотосенсибилизационные свойства и способны усиливать фоточувствительность клеток до 22,31 раза (ФФ = 1,35–22,31; при $p < 0,05$). Ацетоновые, этилацетатные, гексановые, бензольные и хлороформные экстракты из видов *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, а также бензольный из *Cladonia arbuscula* имеют свойство концентрационно-зависимого увеличения их фотосенсибилизирующих свойств (ФФ = 1,35–84,23; при $p < 0,05$) и в концентрации 10 мкг/мл полностью подавляют жизнеспособность опухолевых клеток при воздействии на них суб-токсичных

доз ультрафиолета (ФФ = 254,31; при $p < 0,05$). Ацетоновые, этилацетатные, гексановые и хлороформные экстракты из *Cladonia arbuscula* во всех концентрациях подавляют жизнеспособность опухолевых клеток при воздействии на них суб-токсичных доз ультрафиолета (ФФ = 254,31; при $p < 0,05$). Все, кроме метанольного и этанольного, экстракты из *Xanthoria parietina* обладают достаточно сильными фотосенсибилизирующими свойствами (ФФ = 3,5–172,5; при $p < 0,05$), не зависящими от концентрации. Полученные данные могут служить теоретической основой для разработки методики управляемой коррекции жизнеспособности опухолевых клеток [1–А, 8–А, 10–12–А, 22–А, 25–29–А].

4. Определены факторы, детерминирующие цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов. Различия в цитотоксическом действии экстрактов в отношении эпидермальных клеток человека обусловлены видовой принадлежностью взятого для их получения лишайника на 50,3 % ($R^2 = 0,503$; при $p = 0,0002$). Цитотоксические свойства экстрактов в отношении опухолевых клеток обусловлены в большей степени применяемыми для получения экстракта растворителями на 38 % ($R^2 = 0,38$; при $p = 0,0268$). Модификация экстрактами эффектов облучения эпидермальных клеток человека связана с применяемым для его получения растворителем на 40,3 % ($R^2 = 0,403$; $p = 0,0001$), применяемыми для получения экстрактов видами лишайников и вносимыми концентрациями на 21,9 и 11,4 % соответственно ($R^2 = 0,219$ и $0,114$; $p = 0,0001$ и $0,0036$). Способность экстрактов усиливать фоточувствительность опухолевых клеток детерминирована экспериментальными факторами: взятым для экстракции видом лишайника на 29,4 % ($R^2 = 0,294$; $p < 0,0001$), применяемым для его получения растворителем на 34,2 % ($R^2 = 0,342$; $p < 0,0001$), применяемой концентрацией на 36,6 % ($R^2 = 0,366$; $p < 0,0001$). Определение факторов, детерминирующих их свойства, позволит получать субстанции с заданными свойствами [9–А, 11–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Экстракты из лишайников могут рассматриваться в качестве перспективных фотозащитных субстанций, а также эффективных фотосенсибилизаторов в определенных условиях воздействия на клетки человека. Данные эффекты зависят от условий получения и применения экстрактов, что позволяет достичь управляемого эффекта.

2. В ходе выполнения исследований разработана методика «Оценка фотомодифицирующих свойств веществ методом МТТ-теста в модели клеточной культуры кератиноцитов человека (НАСаТ)». Методика внедрена в

научный процесс Научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет» при проведении первичного скрининга биологической безопасности и фотостабильности различных веществ.

3. Создана разработка «Оценка профилактического действия экстрактов лишайников при воздействии УФ с помощью стандартизированных моделей *in vitro* и *in vivo*», внедренная в учебный процесс кафедры ботаники и физиологии растений УО «Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины». Разработка способствует актуализации научных данных, используемых в преподавании учебных дисциплин специализации и выполнении учебно-исследовательских работ студентов.

Национальным центром интеллектуальной собственности Республики Беларусь выдан патент на изобретение «Фотозащитная биологически активная добавка для косметических составов» (регистрационный номер № 23327). Добавка является эффективным фильтром в области ультрафиолета Б и не оказывает токсического влияния на клетки кожи в пределах эффективных концентраций [32–А].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых журналах

1–А. Храмченкова, О. М. Цитотоксическая активность экстрактов из четырех видов лишайников в отношении культур опухолевых клеток / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2018. – № 2. – С. 88–98.

2–А. Храмченкова, О. М. Цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов из лишайников в отношении линии кератиноцитов человека HaCAT / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2018. – № 3. – С. 81–86.

3–А. Храмченкова, О. М. Фотозащитная активность экстрактов из пяти видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2018. – № 4. – С. 52–62.

4–А. Гончаров, С. В. Оценка эффективности защиты от ультрафиолетового излучения экстрактами лишайника *Нурогymnia physodes* в биологических системах *in vivo* / С. В. Гончаров, А. Е. Козлов, М. В. Матвеевков, И. А. Чешик // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 6. – С. 747–754.

5–А. Храмченкова, О. М. Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства метанольных и ацетоновых экстрактов пяти видов лишайников / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2020. – № 6. – С. 92–98.

6–А. Храмченкова, О. М. Хлороформные и этилацетатные экстракты пяти видов лишайников: фотозащитные, цитотоксические и фотомодифицирующие свойства / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2021. – № 3. – С. 75–80.

7–А. Храмченкова, О. М. Фотозащитные, цитотоксические и фотомодифицирующие свойства неполярных фракций биомассы лишайников в отношении культуры кератиноцитов человека (HaCaT) / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2021. – № 2. – С. 29–35.

8–А. Храмченкова, О. М. Цитотоксическая активность этанольных экстрактов лишайников в отношении клеточных культур / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеевков // Веснік МДПУ імя І. П. Шамякіна. – 2021. – № 1 (57). – С. 42–49.

9–А. Матвеевков, М. В. Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из распространенных лишайников юго-востока Беларуси /

М. В. Матвеенков, О. М. Храмченкова, И. А. Чешик // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 65–75.

10–А.Матвеенков, М. В. Цитотоксические и фотосенсибилизирующие свойства экстрактов из лишайников в отношении линии опухолевых клеток человека (MCF-7) / М. В. Матвеенков, О. М. Храмченкова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2022. – Т. 62, № 6. – С. 602–614.

11–А.Матвеенков, М. В. Детерминанты цитотоксических и фотосенсибилизирующих свойств экстрактов из лишайников в отношении опухолевой линии MCF-7 / М. В. Матвеенков // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2022. – № 6 (135). – С. 32–38.

Материалы конференций

12–А.Матвеенков, М. В. Противоопухолевая активность вторичных метаболитов лишайника *Hypogymnia physodes* (L.) при различных способах экстракции / М. В. Матвеенков // Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике : материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 26–27 апреля 2018 г. / Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека ; под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель, 2018. – С. 70–71.

13–А.Матвеенков, М. В. Цитотоксическая активность вторичных метаболитов ацетоновых экстрактов двух видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / М. В. Матвеенков // Радиобиология: актуальные проблемы : материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 27–28 сентября 2018 г. / Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации ; редкол.: И. А. Чешик [и др.] – Гомель, 2018. – С. 96–97.

14–А.Матвеенков, М. В. Цитотоксическая активность этанольных экстрактов лишайников *Ramalina pollinaria* и *Evernia prunastri* в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / М. В. Матвеенков // Состояние и перспективы разработки, использования биологически активных соединений в научной и практической деятельности : материалы международной научно-практической конференции, Брест, 4–5 октября 2018 г. / Брестский государственный университет ; ред.: С. М. Ленивко. – Брест: БрГУ, 2018. – С. 158–162.

15–А.Матвеенков, М. В. Цитотоксичность вторичных метаболитов *Cadonia arbuscula* при различных способах экстракции в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / М. В. Матвеенков // Дни студенческой науки : материалы XLVII студенческой научно-практической конференции, Гомель, 15–16 мая 2018 г. : в 2 т. / Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины ; редкол.: О. М. Демиденко [и др.]. – Гомель, 2018. – Т. 1. – С. 28–29.

16–А.Матвеенков, М. В. Цитотоксическая активность вторичных метаболитов *Hypogymnia physodes* при различных способах экстракции в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / М. В. Матвеенков // Творчество молодых : сб. научных работ студентов, магистрантов и аспирантов / Гомельский гос. ун-тет им. Ф. Скорины ; редкол.: О. М. Демиденко [и др.]. – Гомель, 2018. – С. 271–273.

17–А. Goncharov, S. Photoprotective properties of lichen extracts (*Hypogymnia physodes*) in vivo and on cell cultures / S. Goncharov, M. Matveyenkau, A. Kazlou, O. Khranchenkova // Abstracts of the 15th International conference on Healthcare ICHC2019, Barcelona, May 27–29 2019 / EuroSciCon. – London, 2019. – P. 40.

18–А.Гончаров, С. В. Фотозащитные свойства экстрактов лишайника *Ramalina pollinaria* in vivo и в культурах клеток / С. В. Гончаров, А. Е. Козлов, М. В. Матвеенков // Лишайники: от молекул до экосистем: материалы конференции, Сыктывкар, 9–13 сентября 2019 г. / Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук ; ред.: С. В. Дегтева [и др.] – Сыктывкар, 2019. – С. 44–45.

19–А.Гончаров, С. В. Комплексная оценка фотозащитных свойств экстрактов лишайника *Evernia prunastri* методами *in vivo* и в культурах клеток / С. В. Гончаров, А. Е. Козлов, М. В. Матвеенков // Радиобиология: Современные проблемы: материалы межд. научно-практ. конференции, Гомель, 26–27 сентября 2019 г. / Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации ; редкол.: И. А. Чешик [и др.] – Гомель, 2019. – С. 55–59.

20–А.Матвеенков, М. В. Эффекты модификации цитотоксического действия ультрафиолетового излучения в отношении кератиноцитов человека (hasat) этанольным экстрактом из *Ramalina pollinaria* / М. В. Матвеенков // Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике: материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 19 июня 2020 г. / ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» ; под общ. ред. доктора мед. наук, доц. А. В. Рожко. – Гомель, 2020. – С. 40–41.

21–А.Матвеенков, М. В. Фотопротекторная активность ацетоновых экстрактов из лишайников *Ramalina pollinaria* и *Cladonia arbuscula* при облучении кератиноцитов человека (HACaT) / М. В. Матвеенков // Радиобиология: современные проблемы: материалы международной научной конференции, Гомель, 24–25 сентября 2020 г. / А. Н. Вараксин ; редкол. : И. А. Чешик [и др.]. – Минск, 2020. – С. 88–89.

22–А.Матвеенков, М. В. Оценка цитотоксического потенциала экстрактов из лишайника вида *Evernia prunastri* в отношении культивируемых опухолевых клеток человека / М. В. Матвеенков // XXIV Международная медико-

биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье»: материалы научной конференции, Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 г. / Санкт-Петербургский гос. ун-т. ; редкол: П. К. Яблонский [и др.]. – СПб.: Сциентиа, 2021. – С. 695–696.

23–А.Матвеенков, М. В. Фотосенсибилизационные эффекты предлучевой обработки стабильных кератиноцитов ацетоновыми и этанольными экстрактами из лишайника вида *Xanthoria parietina* / М. В. Матвеенков // «Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике»: материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 29 апреля 2021 г. / ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» ; под общ. ред. доктора мед. наук, доц. А. В. Рожко. – Гомель, 2021. – С. 46–47.

24–А.Матвеенков, М. В. Сравнение фотомодификационных свойств полярных и неполярных экстрактов некоторых видов лишайников / М. В. Матвеенков // Современные проблемы радиобиологии – 2021: материалы международной научной конференции, Гомель, 23–24 сентября 2021 г. / Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси» ; редкол.: И. А. Чешик [и др.] – Минск : ИВЦ Минфина, 2021. – С. 95–97.

25–А.Матвеенков, М. В. Оценка фотосенсибилизационных свойств гексановых экстрактов из двух видов лишайников в отношении опухолевой линии MCF-7 / М. В. Матвеенков // Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье: материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, Санкт-Петербург, 16 апреля 2022 г. / Санкт-Петербургский государственный университет ; редкол.: И. Ю. Пчелина [и др.] – СПб.: Сциентиа, 2022. – Т. 14. – С. 151–152.

26–А.Матвеенков, М. В. Фотосенсибилизирующие свойства веществ извлеченных из видов лишайников *Hypogymnia physodes* и *Ramalina pollinaria* этилацетатом в отношении опухолевой линии клеток MCF-7 / М. В. Матвеенков // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сборник научных статей XIV Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых, Гомель, 5–6 мая 2022 г.: в 6 т. / ГомГМУ ; редкол.: И. О. Стома [и др.]. – Гомель, 2022. – Т. 5. – С. 179–181.

27–А.Матвеенков, М. В. Фотосенсибилизирующие свойства этилацетатных экстрактов из видов лишайников *Cladonia arbuscula* и *Xanthoria parietina* в отношении опухолевой линии клеток MCF-7 / М. В. Матвеенков // Радиобиология и экологическая безопасность – 2022: материалы международной научной конференции, Гомель, 26–27 мая 2022 г. / Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси» ; редкол.: И. А. Чешик [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2022. – С. 85–86.

Тезисы докладов

28–А.Матвеенков, М. В. Цитотоксическая активность двух экстрактов из лишайника *Cladonia arbuscula* (L.), в отношении различных линий опухолевых клеток человека / М. В. Матвеенков // Молодежь в науке – 2019: тезисы докладов XVI Международной научной конференции молодых ученых, Минск, 14–17 октября 2019 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2019. – С. 364–366.

29–А.Матвеенков, М. В. Эффекты снижения метаболической активности некоторых опухолевых линий клеток человека при их культивировании с экстрактами из *Ramalina pollinaria* и *Evernia prunastri* / М. В. Матвеенков // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е. В. Барковского, Минск, 21 мая 2021 г. / Белорусский государственный медицинский университет ; редкол.: В. В. Хрусталёв [и др.]. – Минск, 2021. – С. 182–183.

30–А.Матвеенков, М. В. Фотомодификационные эффекты неполярных фракций некоторых видов лишайников в отношении стабильных кератиноцитов (НАСаТ) / М. В. Матвеенков // Молодежь в науке – 2021: тезисы докладов XVIII международной научной конференции молодых ученых, Минск, 27–30 сентября 2021 г.: в 2 ч. / Национальная академия наук Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2021. – Ч. 2. – С. 52–54.

31–А.Матвеенков, М. В. Модификация цитотоксического эффекта ультрафиолетового излучения экстрактами из двух видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (НАСаТ) / М. В. Матвеенков // VIII Съезд по радиационным исследованиям: тезисы докладов, Москва, 12–15 октября 2021 г. / Объединённый институт ядерных исследований. – Дубна, 2021. – С. 308.

Патенты и заявки на изобретения

32–А. Фотозащитная биологически активная добавка для косметических составов : пат. ВУ 23327 / О. М. Храмченкова, М. В. Матвеенков. – Оpubл. 28.12.2020.



РЭЗІЮМЭ

Матвеенкаў Мацвей Уладзіміравіч Скрынінг *in vitro* фотаахоўных уласцівасцей экстрактаў з лясных лішайнікаў Беларусі

Ключавыя словы: экстракты з лішайнікаў, культура карцыномы чалавека (MCF-7), стабільныя кератынацыты чалавека (HaCaT), цытатаксічнасць, доза ультрафіялету, мадыфікацыя эфектаў апрамянення.

Мэта даследавання: комплексная ацэнка фотаахоўных уласцівасцяў экстрактаў з пяці пашыраных у Беларусі відаў лішайнікаў у розных *in vitro* сістэмах.

Аб'ект даследавання: экстракты з лішайнікаў – *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina*.

Метады даследавання: радыебіялагічныя, фотаметрычныя, культываванне клетак, біяхімічныя, метады экстракцыі расліннай сыравіны.

Выкарыстаная апаратура: ламінарная шафа (DFaster BH-EN 2004), клеткавы інкубатар (HeraCell 150), спектрафатометр планшэтнага фармату (TECAN Safire²), спектрафатометр кюветны (Specord 205).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: атрымана навуковае абгрунтаванне магчымасці экстракцыі комплексу фотаахоўных і біялагічна актыўных злучэнняў з распаўсюджаных лішайнікаў Беларусі. Вызначаны фактары, якія дэтэрмінуюць цытатаксічныя і фотамадыфікуючыя ўласцівасці экстрактаў з лішайнікаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя даныя дэманструюць магчымасць прымянення шэрагу экстрактаў з мэтай карэкцыі шкоднага ўздзеяння ўльтрафіялетавага выпраменьвання на клеткі скуры чалавека. Вызначэнне фактараў, якія дэтэрмінуюць іх уласцівасці, дазволіць атрымліваць субстанцыі з зададзенымі ўласцівасцямі.

Вобласць прымянення: вынікі даследаванняў могуць быць скарыстаны для абгрунтавання распрацоўкі фотаахоўных складаў на аснове прыроднай сыравіны, неабходнасці правядзення даклінічных і клінічных выпрабаванняў фотапратэктарных уласцівасцяў экстрактаў з лішайнікаў, магчымасці ўвядзення дадатковага артыкула пабочнага лесакарыстання; тэарэтычнай асновы біятэхналогіі культывавання лішайнікаў.

РЕЗЮМЕ

Матвеевков Матвей Владимирович Скрининг *in vitro* фотопротекторных свойств экстрактов из лесных лишайников Беларуси

Ключевые слова: экстракты из лишайников, культура карциномы человека (MCF-7), стабильные кератиноциты человека (HaCaT), цитотоксичность, доза ультрафиолета, модификация эффектов облучения.

Цель исследования: комплексная оценка фотозащитных свойств экстрактов из пяти распространенных в Беларуси видов лишайников в различных *in vitro* системах.

Объект исследования: экстракты из лишайников – *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina*.

Методы исследования: радиобиологические, фотометрические, культивирование клеток, биохимические, методы экстракции растительного сырья.

Использованная аппаратура: ламинарный шкаф (DFaster ВН-EN 2004), клеточный инкубатор (HeraCell 150), спектрофотометр планшетного формата (TECAN Safire²), спектрофотометр кюветный (Specord 205).

Полученные результаты и их новизна: получено научное обоснование возможности экстракции комплекса фотозащитных и биологически активных соединений из распространенных лишайников Беларуси. Определены факторы, детерминирующие цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из лишайников.

Рекомендации по использованию: полученные данные демонстрируют возможность применения ряда экстрактов с целью коррекции вредного воздействия ультрафиолетового излучения на клетки кожи человека. Определение факторов, детерминирующих их свойства, позволит получать субстанции с заданными свойствами.

Область применения: результаты исследований могут быть использованы для обоснования разработки фотозащитных составов на основе природного сырья, необходимости проведения доклинических и клинических испытаний фотопротекторных свойств экстрактов из лишайников; возможности введения дополнительной статьи побочного лесопользования, теоретической основы биотехнологии культивирования лишайников.

SUMMARY

Matveyenkau Matsvei Vladzimirovich
***In vitro* screening of photoprotective properties of extracts**
from forest lichens of Belarus

Keywords: lichen extracts, human carcinoma cells (MCF-7), stable human keratinocytes (HaCaT), cytotoxicity, UV dose, modification of irradiation effects.

Objective: comprehensive assessment of the photoprotective properties of extracts from five species of lichen common in Belarus in various *in vitro* systems.

Research methods: radiobiological, photometric, cell culture, biochemical, methods of extraction of plant materials.

The object of the study: extracts from lichen species – *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina*.

Equipment used: laminar flow hood (DFaster BH-EN 2004), cell incubator (HeraCell 150), plate size spectrophotometer (TECAN Safire²), cuvette spectrophotometer (Specord 205).

Results and innovations: a scientific substantiation of the possibility of extracting a complex of photoprotective and biologically active compounds from common in Belarus lichens was obtained. The factors that determine the cytotoxic and photomodifying properties of lichen extracts have been determined.

Recommended practice: The data obtained demonstrate the possibility of using a number of extracts to correct the harmful effects of ultraviolet radiation on human skin cells. Determining the factors that define their properties will make it possible to obtain substances with desired properties.

Scope: research results can be used to justify the development of photoprotective compositions based on natural raw materials; the need for preclinical and clinical trials of the photoprotective properties of lichen extracts; the possibility of introducing an additional article of secondary forest management; theoretical basis of lichen cultivation biotechnology.

Научное издание

МАТВЕЕНКОВ Матвей Владимирович

**СКРИНИНГ *IN VITRO* ФОТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ
ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛЕСНЫХ ЛИШАЙНИКОВ БЕЛАРУСИ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.01.01 – радиобиология

Подписано в печать 28.03.2024. Формат 60x84 1/16.

Бумага офсетная. Ризография. Усл. печ. л. 1,63.

Уч.-изд. л. 1,78. Тираж 60 экз. Заказ 198.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования

«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины».

Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013 г.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,

распространителя печатных изданий в качестве:

издателя печатных изданий № 1/87 от 18.11.2013 г.;

распространителя печатных изданий № 3/1452 от 17.04.2017 г.

Ул. Советская, 104, 246028, Гомель.