

Методические основы оценки фотозащитных свойств экстрактов из лишайников

О.М. ХРАМЧЕНКОВА

Для ацетонового, бензольного, метанольного, хлороформного, этанольного и этилацетатного экстрактов из лишайников *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Ramalina pollinaria* оценивали величины солнцезащитного фактора (SPF), критической длины волны ($\lambda_{\text{крит}}$) и отношения УФ-А/УФ-Б. Использовали концентрации растворов экстрактов 200 мкг/мл, а также IC_{50} и IC_{10} , установленные для культуры кератиноцитов человека (НАСаТ). Показано, при оценке фотозащитных свойств экстрактов из лишайников следует учитывать их цитотоксичность для клеточных культур кожи человека.

Ключевые слова: экстракты из лишайников, ультрафиолет, спектры поглощения, параметры фотозащиты, культура кератиноцитов человека (НАСаТ), цитотоксичность, IC_{50} и IC_{10} .

For acetone, benzene, methanol, chloroform, ethanol and ethyl acetate extracts from the lichens *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* and *Ramalina pollinaria*, the sun protection factor (SPF), critical wavelength (λ_{crit}) and UV-A/UV-B ratio were assessed. Extract solution concentrations of 200 $\mu\text{g/ml}$ were used, as well as IC_{50} and IC_{10} established for human keratinocyte culture (НАСаТ). It has been shown that when assessing the photoprotective properties of extracts from lichens, their cytotoxicity for cell cultures of human skin should be taken into account.

Keywords: lichen extracts, ultraviolet, absorption spectra, photoprotection parameters, human keratinocyte culture (НАСаТ), cytotoxicity, IC_{50} and IC_{10} .

Введение. Возрастание интереса научного сообщества к лишайникам выражается в стремительном росте количества публикаций, посвященных различным аспектам их систематики, физиологии, биохимии и экологии. Важное место занимают работы в области скрининга тех свойств лишайников, которые могут быть использованы человеком для решения ряда насущных задач. В этом смысле широко исследуемыми объектами являются экстракты из лишайников, получаемые с использованием различных растворителей в качестве экстрагентов.

Если не использовать культивируемые микобионты, а сосредоточиться на натуральном сырье, то становится очевидным, что для получения экстрактов имеет смысл использовать те виды лишайников, которые не просто часто встречаются на данной территории, но образуют значимые запасы биомассы. В этом случае возможен их сбор в природных условиях с учетом сезона, для которого показано максимальное содержание вторичных метаболитов, если такие данные для данного вида лишайников вообще имеются. Помимо этого, желательно, чтобы собираемые виды были хорошо узнаваемы в природе, не имели набора хеморас (отличающихся составом вторичных метаболитов), характеризовались такой морфологией слоевищ, которая позволила бы извлечь талломы с субстрата произрастания без повреждений и потерь органов размножения, часто несущих существенный запас лишайниковых веществ.

Собранную биомассу лишайников необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию для выполнения следующих операций: тщательный осмотр каждого слоевища на предмет целостности и соответствия целевому изучаемому виду; удаление отмерших участков слоевищ, различных примесей и мусора; организация условий для сушки. Последнее предполагает не только защиту биомассы лишайников от возможного вторичного увлажнения и чрезмерной освещенности, но также наличие «подложки», на которой могли бы собираться органы размножения, которые неизбежно отламываются от подсыхающих слоевищ. Высушивание биомассы лишайников целесообразно производить до воздушно-сухого состояния, после чего ее необходимо измельчить.

Чтобы избежать грубых искажений результатов исследования, сухую биомассу необходимо измельчать до размеров частиц, исчисляемых микрометрами, так как только в этом случае их размеры будут сопоставимы с диаметрами органов размножения лишайников, что позволит от-

бирать навески для экстрагирования, сколько-нибудь равноценно отражающие структуру и биохимический состав слоевищ. Выбор величины навески, растворителя, способа экстрагирования обсуждался нами в [1]. Скажем лишь, что водные экстракты из биомассы лишайников представляют собой субстанции принципиально иного состава, чем полученные с использованием ацетона, бензола, метанола или любого другого органического растворителя. Кроме того, имеет смысл ориентироваться на Международные лихенологические базы данных, в которых приводится состав вторичных метаболитов данного вида лишайников. В этом случае выбор экстрагента может быть обоснован свойствами этих веществ, их растворимостью в том или ином растворителе.

Полученный экстракт нуждается в отгонке растворителя и высушивании до твердого состояния. Здесь возможны методические трудности, связанные с тем, что далеко не все экстракты из лишайников, полученные с использованием органических растворителей различной полярности, при высушивании становятся твердыми и измельчаются до порошкообразного состояния. Экстракты бывают смолоподобными, в силу чего их следует высушивать, распределяя тонким слоем и постоянно перемешивая, до достижения постоянной массы при условиях сушки. Согласно данным множества экспериментальных работ, перечисленных в [1], и на основании собственного опыта, можно рекомендовать хранение экстрактов из лишайников в герметичных емкостях при низких температурах (например, при минус 18 °С).

В зависимости от вида дальнейшего исследования, экстракты из лишайников растворяют в том или ином растворителе. В случае определения фотозащитных свойств экстракта, его растворяют в 96 % этаноле, при этом раствор не бывает прозрачным – сухой экстракт никогда полностью не растворяется даже в растворителе, при помощи которого он был получен. Следовательно, следующей задачей является отделение нерастворимой части экстракта и последующее определение концентрации получаемого раствора, на основании чего возможно приготовление целевых растворов (200 мкг/мл [2]). Именно такую концентрацию экстракта рекомендовано использовать для спектрофотометрического определения величин солнцезащитного фактора SPF (Sun Protection Factor), а также критической длины волны ($\lambda_{\text{крит}}$) и показателя широты фотозащиты в диапазонах ультрафиолета Б (УФ-Б, 280 ÷ 320 нм) и ультрафиолета А (УФ-А, 320 ÷ 400 нм) [3], [4].

Прежде чем изучать фотозащитные свойства растворов экстрактов из лишайников с концентрацией 200 мкг/мл, целесообразно получить их спектры поглощения в диапазоне 290 ÷ 400 нм, убедиться в том, что значения оптических плотностей растворов не выходят за пределы шкалы спектрофотометра. Для растворов экстрактов из лишайников такое происходит достаточно часто. В этом случае необходимо доказать линейности зависимости оптической плотности растворов экстрактов от их концентрации, а также установить параметры данной зависимости, что позволит вычислить искомые значения для заданной концентрации.

Наконец, весьма полезным является определение параметров фотозащиты для растворов экстрактов из лишайников, приготовленных в концентрациях, соответствующих их полулетальным значениям для культур клеток кожи человека – например, для культуры кератиноцитов НАСаТ. Известно, что многие экстракты из лишайников цитотоксичны для клеток кожи [5], [6]. Поэтому дальнейшая разработка солнцезащитного средства из лишайников может оказаться нецелесообразной, поскольку растворы их экстрактов в полулетальных для кератиноцитов концентрациях могут характеризоваться низкими уровнями фотозащиты.

В настоящей работе приводится авторская модификация методики определения фотозащитных свойств экстрактов из лишайников.

Методы исследований. Биомассу лишайников *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. и *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. собирали в пригородных лесах г. Гомеля на типичных для каждого вида субстратах. Сбор, камеральную обработку, сушку и измельчение природного сырья осуществляли с учетом всего, сказанного выше. Навески биомассы лишайников экстрагировали в аппарате Сокслета ацетоном, бензолом, метанолом, хлороформом, этанолом и этилацетатом. Растворители удаляли, экстракты высушивали, гомогенизировали, хранили при минус 18 °С.

Навески экстрактов из лишайников массой около 0,25 г заливали 25 мл этанола, выдерживали 7 суток при периодическом встряхивании, после чего эмульсии экстрактов фильтровали через предварительно взвешенные фильтры. Определяли процент нерастворимой в этаноле части экстракта, а также истинную концентрацию полученного раствора.

Далее готовили спиртовые растворы экстрактов из лишайников с концентрацией 200 мкг/мл, при помощи УФ-спектрофотометра получали спектры поглощения в диапазоне 290 ÷ 400 нм. Определяли виды растворов, чьи величины оптических плотностей выходят за пределы шкалы спектрофотометра. Для таких экстрактов готовили разведения с концентрациями (в мкг/мл) 25, 50, 75, 100, 125, 150 и 175. Для каждого разведения получали спектры поглощения в указанном диапазоне, после чего для каждой концентрации разведений определяли величину оптической плотности при $\lambda = 290, 295, 300 \dots 400$ нм. Строили графики зависимости оптической плотности раствора при данной величине длины волны от его концентрации, доказывали линейность этой зависимости, определяли параметры зависимости. По полученным зависимостям рассчитывали значения оптических плотностей для концентрации растворов 200 мкг/мл, на основании которых вычисляли величины фотозащитных параметров анализируемых видов экстрактов – SPF, $\lambda_{\text{крит}}$ и УФ-А/УФ-Б [2], [4], [7]. Оцененные параметры позволяли судить о фотозащитных свойствах экстрактов из лишайников.

Далее готовили растворы экстрактов в концентрациях, соответствующих определенным нами полулетальным значениям для культуры кератиноцитов (HACaT) [8]. Получали для них спектры поглощения в диапазоне 290 ÷ 400 нм, снова рассчитывали величины SPF, $\lambda_{\text{крит}}$ и УФ-А/УФ-Б. На основании полученных данных делали выводы о пригодности экстрактов из лишайников для использования в качестве фотозащитных средств, не токсичных для клеток кожи человека.

Повторность всех операций – пятикратная, средство измерения – спектрофотометр Solar PV 2201, измерительные кюветы – кварцевые, длина оптического пути 10 мм. Анализ результатов исследования осуществляли с помощью программного продукта Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. В процессе отгонки растворителя и последующего высушивания окрашенных, но абсолютно прозрачных растворов экстрактов из лишайников происходят процессы образования веществ, не растворимых в 96 % этаноле. Данное событие происходит даже в этанольных экстрактах, каковые после удаления экстракта и высушивания затем полностью в этаноле не растворяются – рисунок 1. От 11,7 % до 27,7 % массы этанольных экстрактов из лишайников составляла нерастворимая фракция. Для ацетоновых экстрактов вклад нерастворимой фракции составлял до $38,5 \pm 0,84$ %; для бензольных – до $56,9 \pm 0,52$ %; для метанольных – до $20,3 \pm 0,35$ %; для хлороформных – до $47,9 \pm 0,38$ %; для – до $62,9 \pm 0,84$ %. Наибольшее количество экстрактивных веществ переходит в раствор при растворении в этаноле спиртовых экстрактов из лишайников. Экстракты из *Hypogymnia physodes* и *Ramalina pollinaria* растворяются лучше других. Это свойство экстрактов необходимо учитывать при их получении для дальнейшего использования.

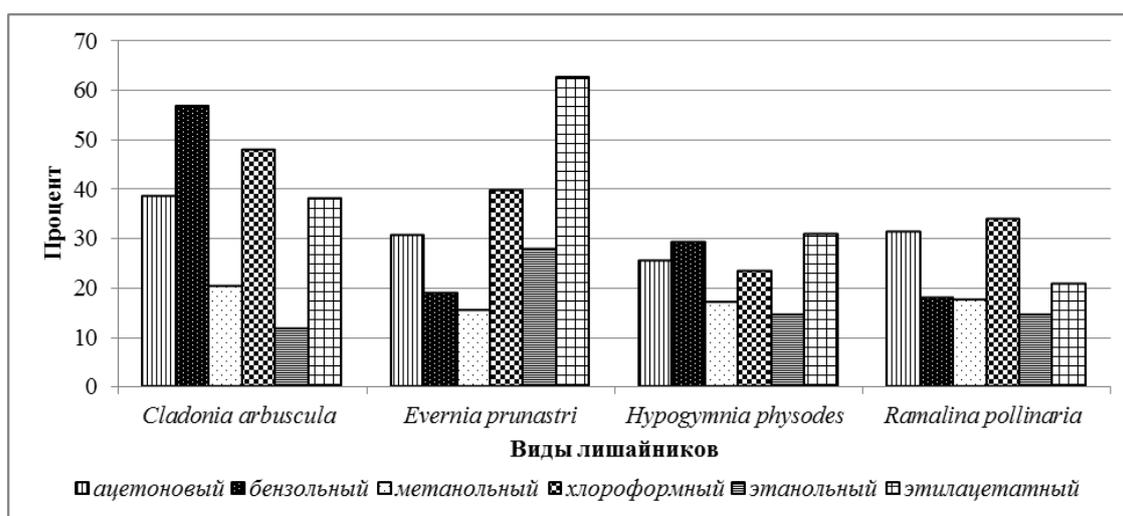


Рисунок 1 – Процентный вклад нерастворимой фракции в состав экстрактов из лишайников

В качестве примера выхода величин оптических плотностей за пределы шкалы спектрофотометра приводим спектрограммы растворов экстрактов из *R. pollinaria* – рисунок 2.

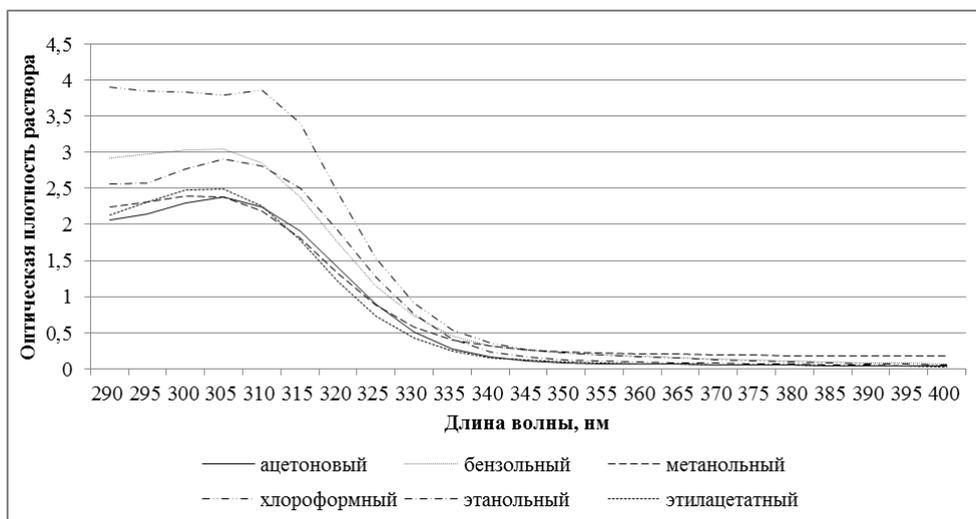


Рисунок 2 – Спектры поглощения растворов экстрактов из *R. pollinaria* (200 мкг/мл)

Очевидно, что практически все линии спектра в области УФ-Б (290 ÷ 320 нм) выходят за пределы шкалы спектрофотометра или приближаются к таковым.

На рисунке 3 приведены спектры растворов разведения хлороформных экстрактов из *R. pollinaria*, а также графики зависимости оптической плотности растворов от их концентрации в диапазонах УФ-Б и УФ-А.

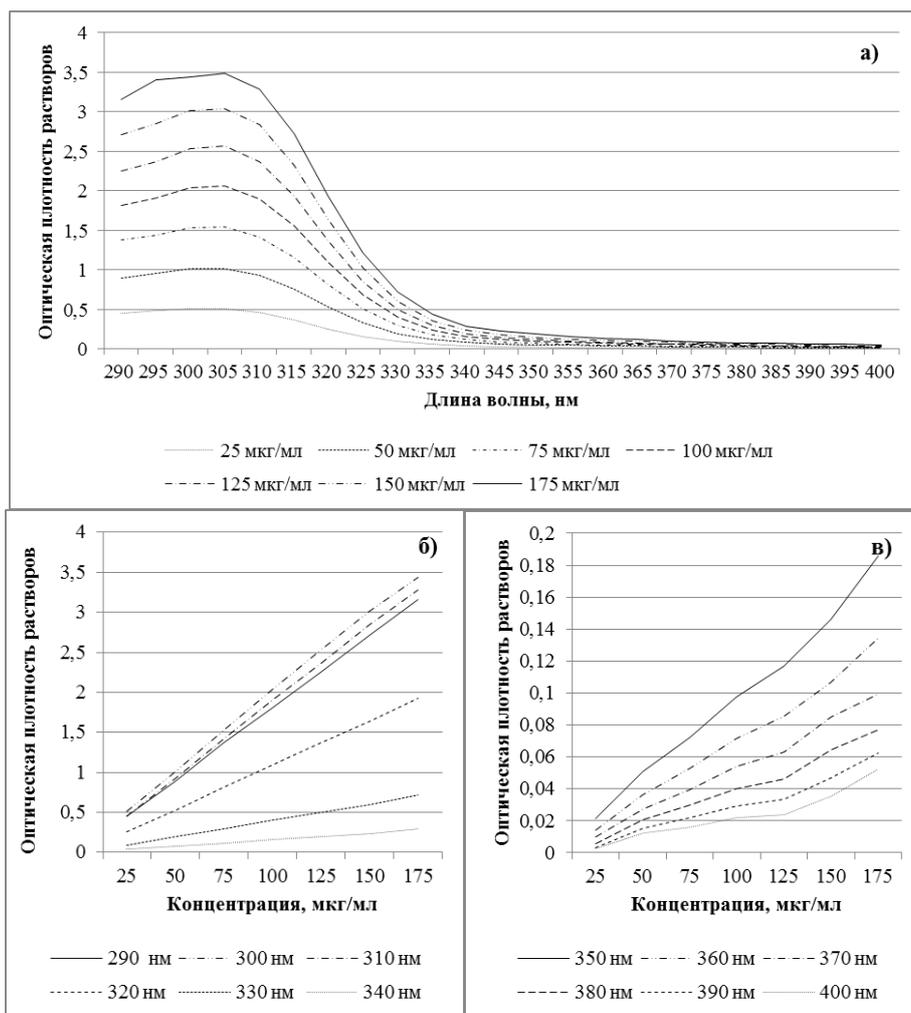


Рисунок 3 – Спектры поглощения растворов разведения экстрактов из *R. pollinaria* (а) и графики зависимости оптической плотности раствора от концентрации в области УФ-Б и коротковолнового УФ-А (б), длинноволнового УФ-А (в)

Линии спектра поглощения (рисунок 3а) позволяют говорить об отсутствии химического взаимодействия веществ экстракта с растворителем, а графики зависимости оптической плотности от концентрации раствора – вычислить параметры уравнения $y = ax \pm b$, которым они описываются, и на этой основе рассчитать значения оптических плотностей растворов для концентрации 200 мкг/мл. Следует отметить, что линейность зависимости оптической плотности растворов от концентрации статистически надежно доказана для всех изучаемых экстрактов из лишайников.

Величины параметров фотозащиты изучаемых экстрактов из лишайников были установлены как путем прямого измерения оптической плотности растворов, так и с применением аппроксимации установленных зависимостей для расчета крайних значений. Все проанализированные экстракты из лишайников обладают средними (SPF = 8 ÷ 12), высокими (SPF = 15 ÷ 25) и очень высокими (SPF = 30 ÷ 50) фотопоглощительными свойствами в диапазоне УФ-Б, но не являются фотозащитными, так как не соблюдается основное правило: $SPF \geq 15,0$ и $\lambda_{\text{крит}} \geq 373,0$ [2], [4]. Поглощение УФ-А экстрактами из лишайников стремится к нулю.

Полулетальные для культуры кератиноцитов (НАСаТ) концентрации экстрактов из изучаемых лишайников (IC_{50}) редко превышают 100 мкг/мл, а половина из них – ниже 50 мкг/мл [8]. Очевидно, что такие разбавленные растворы существенно слабее поглощают ультрафиолет – таблица.

Таблица – Фотозащитные свойства экстрактов лишайников при полулетальных для культуры кератиноцитов человека (НАСаТ) концентрациях

Виды экстрактов	Виды лишайников			
	<i>C. arbuscula</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>R. pollinaria</i>
SPF, абс. ед.				
Ацетоновый	0,8 ± 0,08	3,3 ± 0,29	2,2 ± 0,19	11,4 ± 0,82
Бензольный	2,3 ± 0,12	10,2 ± 0,84	3,2 ± 0,41	7,5 ± 0,77
Метанольный	5,0 ± 0,27	10,4 ± 0,95	4,8 ± 0,63	12,2 ± 1,01
Хлороформный	1,0 ± 0,03	11,4 ± 0,99	2,9 ± 0,18	9,9 ± 0,84
Этанольный	1,1 ± 0,06	14,7 ± 1,08	1,6 ± 0,11	8,5 ± 0,69
Этилацетатный	2,1 ± 0,15	19,5 ± 1,49	3,9 ± 0,34	14,2 ± 1,14
$\lambda_{\text{крит}}$, нм				
Ацетоновый	350 ± 2,18	342 ± 2,65	348 ± 2,28	329 ± 2,14
Бензольный	357 ± 2,93	344 ± 2,11	342 ± 2,49	335 ± 2,33
Метанольный	358 ± 2,45	345 ± 2,27	343 ± 2,73	349 ± 2,08
Хлороформный	362 ± 2,98	337 ± 2,67	345 ± 2,16	328 ± 2,26
Этанольный	356 ± 2,83	334 ± 2,39	346 ± 2,38	329 ± 2,37
Этилацетатный	361 ± 2,99	332 ± 2,87	351 ± 2,84	327 ± 2,15
УФ-А/УФ-Б, абс. ед.				
Ацетоновый	0,51 ± 0,041	0,33 ± 0,036	0,57 ± 0,031	0,25 ± 0,019
Бензольный	0,54 ± 0,035	0,43 ± 0,039	0,54 ± 0,038	0,31 ± 0,024
Метанольный	0,65 ± 0,049	0,42 ± 0,038	0,64 ± 0,039	0,38 ± 0,025
Хлороформный	0,62 ± 0,044	0,33 ± 0,031	0,65 ± 0,042	0,22 ± 0,017
Этанольный	0,60 ± 0,047	0,34 ± 0,035	0,66 ± 0,041	0,27 ± 0,019
Этилацетатный	0,68 ± 0,049	0,31 ± 0,041	0,67 ± 0,043	0,20 ± 0,014

При разведении растворов экстрактов из лишайников до концентраций, соответствующих полулетальным значениям для культуры кератиноцитов человека, большинство из них теряют фотозащитные свойства или переходят в разряд средств с низким уровнем фотозащиты (SPF = 2 ÷ 6) [2], [4]. На нижней границе высокого уровня фотозащиты остаются только этанольный и этилацетатный экстракты из *E. prunastri* и этилацетатный из *R. pollinaria*. При этом следует учитывать, что при данных концентрациях растворов экстрактов из лишайников в среде культивирования погибает половина кератиноцитов кожи человека.

Если в качестве критерия пригодности экстрактов из лишайников для разработки фотозащитных субстанций использовать параметр IC_{10} (концентрация, при которой повреждается 10 % клеток культуры НАСаТ) [8], то оказывается, что этилацетатный экстракт из *E. prunastri* сохра-

няется на нижней границе высокого уровня фотозащиты ($SPF = 13,8 \pm 1,85$). Данный факт связан не с особыми фотозащитными свойствами этилацетатного экстракта из *E. prunastri*, а с его величинами IC_{10} и IC_{50} – 41,1 мкг/мл и 69,0 мкг/мл, соответственно. Для других видов экстрактов величины IC_{10} и IC_{50} могут отличаться в несколько раз, обладая при этом не самыми высокими значениями SPF при концентрации раствора 200 мкг/мл (речь, разумеется, идет об экстрактах, для которых показано отсутствие цитотоксичности в отношении НАСаТ).

В категории экстрактов из лишайников, обладающих средним уровнем фотозащиты при концентрациях, равных IC_{10} , оказались этанольный из *E. prunastri*, а также метанольный и этилацетатный из *R. pollinaria*. Величины SPF упомянутых экстрактов составили $7,6 \pm 0,59$; $9,1 \pm 0,84$ и $9,3 \pm 0,75$, соответственно. Следует отметить, что все растворы экстрактов из лишайников, разведенные до концентраций IC_{10} и IC_{50} , не являются собственно фотозащитными, так как величины критической длины волны не превышали 350 нм. Из этого следует, что экстракты из лишайников в нетоксичных для кератиноцитов человека концентрациях могут использоваться лишь для усиления защиты в области УФ-Б.

Заключение. Предложена авторская модификация методики предварительной оценки фотозащитных свойств экстрактов из лишайников. Использовали ацетоновые, бензольные, метанольные, хлороформные, этанольные и этилацетатные экстракты из *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Ramalina pollinaria*, полученные путем экстракции по Сокслету. Показано, что от 11,7 % до 62,9 % массы сухих экстрактов не растворяется в 96 % этаноле. Использование растворов экстрактов с концентрацией 200 мкг/мл при спектрофотометрическом определении основных показателей фотозащиты требует дополнительных операций для статистически надежного подтверждения линейности зависимости оптической плотности от концентрации и последующей экстраполяции. Окончательное решение о дальнейшем использовании экстрактов из лишайников целесообразно принимать после определения фотозащитных параметров их растворов в нетоксичных для клеток кожи человека концентрациях.

Литература

1. Храменкова, О. М. Антиоксидантные и цитотоксические свойства экстрактов из лишайников / О. М. Храменкова ; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2022. – 224 с.
2. Rojas, J. L. Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes / J. L. Rojas, M. Díaz-Santos, N. A. Valencia-Islas // UK J Pharm Biosci. – 2015. – Vol. 3. – P.18–26.
3. Donglikar, M. M. Sunscreens : A review / M. M. Donglikar, S. L. Deore // Pharmacognosy Journal. – 2016. – Vol. 6 (3). – P. 171–179.
4. Springsteen, A. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance / A. Springsteen, R. Yurek, M. Frazier, K. F. Carr // Analytica Chimica Acta. – 1999. – Vol. 380 (2-3). – P. 155–164.
5. *Cladonia uncialis* as a valuable raw material of biosynthetic compounds against clinical strains of bacteria and fungi / E. Studzińska-Sroka [et al.] // Acta Biochimica Polonica. – 2019. – Vol. 66 (4). – P. 597–603.
6. Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var. *compressum*, two lichens from Colombian páramo region / L. S. Perico-Franco [et al.] // Pharmaceutical and Biosciences Journal. – 2015. – Vol. 3 (4). – P. 31–38.
7. Mansur, J. S. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria / J. S. Mansur, M. N. R. Breder, M. C. A. Mansur, R. D. Azulay // An. Bras. Dermatol. – 1986. – Vol. 61 (4). – P. 121–124.
8. Матвеенков, М. В. Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из распространенных лишайников юго-востока Беларуси / М. В. Матвеенков, О. М. Храменкова, И. А. Чешик // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 65–75.