

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК [577.34:614.875]:[615.451.16:582.29]:[57.084.1+57.085.2]

ОЦЕНКА *IN VITRO* И *IN VIVO* ФОТОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИШАЙНИКОВ

© 2024 г. С. В. Гончаров^{1,*}, О. М. Храмченкова², А. Е. Козлов³

¹ Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

² Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины,
Гомель, Беларусь

³ Гомельский государственный медицинский университет,
Гомель, Беларусь

* E-mail: combinexpo@gmail.com

Поступила в редакцию 01.02.2023 г.

После доработки 15.08.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2024 г.

В серии экспериментов изучены фотозащитные свойства этанольных и этанольно-касторовых композиций на основе перспективных комбинаций экстрактов лишайников (1:1) по совокупности параметров: 1) SPF, $\lambda_{\text{крит}}$ и УФ-А/УФ-Б — *in vitro*; 2) морфофункциональных характеристик кожи, про- и антиоксидантных процессов в крови мышей линии Af после местного применения композиций и воздействия УФ-А/В — *in vitro*. Фотометрические исследования в целом показали очень высокий уровень фотозащиты у всех созданных лишайниковых композиций, которые близки друг к другу количественно и приближаются к категории “солнцезащитные средства”. По сочетанию “SPF — $\lambda_{\text{крит}}$ — УФ-А/УФ-Б” выгодно выделяются композиции на основе комбинации экстрактов “этилацетатный *Cladonia arbuscula* + метанольный *Ramalina pollinaria*”. По биохимическим и морфометрическим параметрам этанол и 30%-ный раствор касторового масла в этаноле не оказали заметного модифицирующего влияния на действие УФ на кожу и сыворотку крови и могут применяться для топических аппликаций лишайниковых экстрактов. Среди испытываемых этанольных композиций экстрактов во всей серии экспериментов в концентрациях 0, и 15–20 г/л по сумме величин тяжести ожога при 20-минутном УФ-воздействии наибольший фотозащитный эффект проявили комбинации экстрактов “этилацетатный *C. arbuscula* + метанольный *R. pollinaria*” и “бензольный *Evernia prunastri* + этанольный *C. arbuscula*” (5–6 баллов по 10-балльной шкале). Данные комбинации экстрактов схожим образом работали и в этанольно-касторовых композициях, где показали менее стабильный фотозащитный эффект. Введение касторового масла в этанол по совокупности значений повышало тяжесть ожога на 6.5–10.5% для всех комбинаций экстрактов. Совокупность УФ-эффектов по биохимическим параметрам, проявляющим четкую направленность (GPx, TBARS, ТАОС, GSH), показывает фотосенсибилизирующий характер всех лишайниковых композиций в концентрации 0,2 г/л. В наибольшей степени это наблюдалось для комбинации метанольных экстрактов *Hypogymnia physodes* и *C. arbuscula*. Наименьшая фотосенсибилизация отмечена для комбинации экстрактов “этилацетатный *C. arbuscula* + метанольный *R. pollinaria*”, которая в составе разных композиций и по совокупности фотометрических, биохимических и морфометрических параметров проявила наиболее выраженные фотопротекторные свойства.

Ключевые слова: лишайники, ультрафиолет, этанол, касторовое масло, SPF, фотопротекторы, глутатион, ТБК-продукты, антиоксидантная емкость

DOI: 10.31857/S0869803124040055, EDN: LOEETU

В настоящее время исследование эффектов воздействия УФ-излучения на здоровье человека и состояние окружающей среды является актуальным и своевременным из-за продолжающегося истощения озонового слоя над странами умеренного климатического пояса и, следовательно, возрастания уровней УФ облученности на поверхности Земли [1].

Солнечный УФ оказывает как положительное (инициирует процессы образования витамина D_3), так и отрицательное действие на человека: установлено, что УФ-излучение способно инициировать фотодерматозы и провоцировать развитие пре- и неопластических процессов в коже человека [2]. При этом основным фактором, ответственным за возникновение рака кожи, являются УФБ-лучи, которые оказывают прямое повреждающее воздействие на ДНК клетки, вызывая мутации и злокачественное перерождение. Вместе с тем опосредованную роль в канцерогенезе отводят и УФА-лучам, под действием которых генерируются свободные радикалы, приводящие к повреждению мембранных липидов, белков и деструкции ДНК. Такое синергическое действие УФА- и УФБ-лучей только усиливает канцерогенез.

Одним из ключевых профилактических мероприятий при защите от чрезмерного действия УФ является правильное применение фотозащитных средств [3]. Защита от УФ представляет собой сложную проблему, включающую различные биологические активности и факторы, влияющие на эффективность солнцезащитного средства. Наиболее важные биологические моменты в УФ-защите можно свести к шести основным категориям: 1) способность экранировать в широком диапазоне УФА/УФБ излучения; 2) антиоксидантная и реактивная кислородная активность; 3) антимуtagenная активность; 4) противоопухолевые свойства; 5) бустер-эффект (усиление SPF УФ-фильтров); 6) стабильность безопасности активных соединений (нетоксичных, неканцерогенных, несенсибилизирующих) [4].

Кроме того, современные препараты должны быть устойчивыми к свету, нагреванию, воде; иметь низкую проникающую способность через роговой слой кожи; эффективно предотвращать, фотостарение, фотодерматозы.

В настоящее время в состав солнцезащитных препаратов входят физические (диоксид титана и оксид цинка) и химические фильтры, задерживающие солнечные лучи. Физические остаются на коже и эффективно отражают и преломляют УФ. Однако такие соединения могут проявлять

фотокаталитические свойства, что может являться причиной поражения тканей [5]. Химические фильтры, улавливая УФ-лучи, преобразуют их в безвредное для кожи тепло.

Актуальны поиск и разработка состава солнцезащитных средств с использованием веществ растительного происхождения. Недостатком большинства солнцезащитных средств, особенно синтетических и минеральных, является то, что они, например, блокируют УФБ-лучи, но не защищают кожу от УФА-лучей. Есть сообщения, что применяемые химические фильтры в зависимости от конкретного используемого вещества (ацетилсалициловая кислота и ее соли, авобензон, мексорил, тиносорб и др.) способны защищать в определенной мере либо от УФА-, либо от УФБ-лучей, либо при комбинации средств — от обоих типов лучей, но их применение при этом способно вызвать аллергию и купероз [6].

Антиоксидантное действие играет ключевую роль в фотопротекторной активности растительных экстрактов [7]. Существует ряд методов для прогностической оценки антимуtagenной или противоопухолевой активности *in vitro*. Корректный скрининг нового вещества или смеси должен включать по крайней мере один из методов [8].

При оценке противовоспалительных свойств учитывать следует то, что УФ вызывает воспаление с индукцией экспрессии циклооксигеназы-2, приводя к увеличению продукции метаболитов простагландина. Также УФ повышает экспрессию противовоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли, интерлейкины-1 и -6) [4].

Относительно новой, не до конца изученной и достаточно сложной является тема “эффекта бустера”. Уже известны соединения, которые могут усиливать SPF УФ-фильтров [9, 10], но механизмы, ответственные за бустерные эффекты, неоднородны и часто непредсказуемы; некоторые из них связаны с природой УФ-фильтров. На самом деле трудно однозначно определить общие характеристики ингредиента с бустерным эффектом. Три основные стратегии, доступные для достижения “эффекта бустера”, — это взаимодействие с УФ-фильтрами на физико-химическом уровне для оптимизации эффективности смеси УФ-поглотителей [9], реализация правильной рецептуры и улучшение пленкообразующих свойств (использование смягчающих и пленкообразователей). Ценны также ингредиенты, улучшающие распределение УФ-фильтров и повышающие растекаемость смеси [11].

В настоящее время существует несколько тестов *in vitro* для определения SPF. Все они основаны на спектрофотометрическом измерении поглощения тонкой пленкой продукта, нанесенной на УФ-прозрачные подложки, которые должны быть максимально приближены к физическим характеристикам кожи [10]. Влиять на точность и повторяемость тестов *in vitro* SPF могут различные составы фильтров, толщина и однородность нанесенного солнцезащитного крема, тип спектрофотометра, шероховатость подложки и др.

В настоящее время метод *in vivo* по-прежнему является официальным стандартом защиты от УФ-излучения (ISO 2444:2010), и разработчики продукта должны проводить испытания *in vivo* на конечном продукте и *in vitro* на всех этапах разработки [4].

Разработка новых солнцезащитных средств на основе растительных веществ способна увеличить диапазон защиты кожи не от проникновения солнечного излучения, а благодаря наличию в составе компонентов лишайников природных антиоксидантов, способных подавлять УФ-индуцированные свободнорадикальные механизмы.

Цель работы — оценить фотозащитные свойства перспективных комбинаций из лишайниковых экстрактов методами *in vitro*, а также на основе морфометрических и биохимических параметров *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Получение экстрактов лишайников. Биомассу лишайников *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. и *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. отбирали в лесах, прилегающих к черте г. Гомель, на типичных для каждого вида субстратах. Образцы высушивали до воздушно-сухого состояния, экстрагировали по Сокслету, растворители удаляли ротационным испарением, экстракты высушивали [12]. Композиции экстрактов из лишайников создавали следующим образом: сухие экстракты смешивали в пропорции 1:1, после чего растворяли либо в чистом этаноле, либо в 30%-ном растворе касторового масла в этаноле:

- 1) метанольный экстракт из *H. physodes* + метанольный из *C. arbuscula*;
- 2) бензольный экстракт из *E. prunastri* + этанольный из *C. arbuscula*;
- 3) этилацетатный экстракт из *C. arbuscula* + метанольный из *R. pollinaria*;

4) этанольный экстракт из *H. physodes* + бензольный из *R. pollinaria*;

5) метанольный экстракт из *H. physodes* + метанольный из *C. arbuscula* + касторовое масло;

6) бензольный экстракт из *E. prunastri* + этанольный из *C. arbuscula* + касторовое масло;

7) этилацетатный экстракт из *C. arbuscula* + метанольный из *R. pollinaria* + касторовое масло;

8) этанольный экстракт из *H. physodes* + бензольный из *R. pollinaria* + касторовое масло.

Данные тестируемые комбинации были подобраны на основе данных, полученных в экспериментах *in vitro* — фотометрии экстрактов и их последующем применении в культурах кератиноцитов человека.

Оценка фотозащитных свойств лишайниковых композиций *in vitro*. Использованы процедуры, описанные у авторов [12]. Определяли оптическую плотность растворов на УФ-спектрофотометре Solar PB 2201 (кюветы — кварцевые) в диапазоне длин волн 290–320 нм с шагом в 5 нм, снимали спектры поглощения в диапазоне 289–400 нм, используя этанол или 30%-ный раствор касторового масла в этаноле в качестве растворов сравнения. По результатам измерения рассчитывали величину SPF, $\lambda_{\text{крит}}$, УФ-А/УФ-Б.

Оценка фотозащитных свойств лишайниковых композиций *in vivo*. Использованы мыши линии Af в возрасте 2.5–3 мес., которые находились на стандартной диете в виварии. В сериях предварительных экспериментов оценивали динамику развития реакции кожи животных на облучение ультрафиолетом при обработке ее этанолом или 30%-ным раствором касторового масла в этаноле. Комбинации экстрактов из лишайников применялись в концентрациях 0,2 мг/мл и 15–20 мг/мл. Тестируемые субстанции наносили на кожу спины (на мыш — 1 × 150 мкл) спустя 3 сут после удаления шерсти депилятором. Воздействие УФ на животных (15 см от спины) осуществляли облучением участка спины УФ-лампой через 30 мин после нанесения экстрактов из лишайников или контрольных растворов. Энергетический максимум УФ-излучения 315 нм, расчетная интегральная (280–450 нм) мощность светового потока 1446 мкВт/см². Соотношение УФ-Б / УФ-А = 40/60%. Животных облучали в течение 20 мин под уретановым наркозом (1 г/кг), выводили из опыта на 4-е и 11-е сутки после облучения. Фотодокументировали внешнее состояние кожи. Определяли толщину кожной складки при помощи штангенциркуля;

высекали стандартным пробойником два кожных диска и взвешивали. Кожную реакцию оценивали по наличию эритемы, отека и других повреждений кожного покрова по шкале Adachi T., Satou Y. [13]: + наличие слабо выраженной эритемы и/или отека; ++ эритема и/или отек и/или трещины в коже умеренной степени выраженности; +++ сильно выраженная эритема и/или отек и/или трещины в коже, изъязвления. Дальнейшую оценку тяжести ожога проводили по разработанной нами шкале, адаптированной для линии Af.

Биохимический анализ сыворотки крови проводили при аппликациях экстрактов в концентрации 0.2 мг/мл. Общий белок определяли (биуретовым методом с использованием тест-системы фирмы “Анализ-Плюс” (Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя) и выражали в г/л.

Антиоксидантную емкость ТАОС (total antioxidant capacity) сыворотки определяли флуоресцентным методом по ингибированию окисления флуоресцеина свободными радикалами, образующимися при термическом (37°C) разложении 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида и выражали в мкмоль эквивалентов тролокса/мл сыворотки [14, 15]. Калибровочный график строили по тролоксу E [16].

Концентрацию сульфгидрильных групп (SH-групп) оценивали по реакции их взаимодействия с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (реактивом Элмана), в ходе которой при pH 8.0 образуется тионитрофенильный анион с пиком поглощения на длине волны 412 нм [17]. Концентрацию SH- групп выражали в нмоль SH-групп / мг белка.

Содержание глутатионовых и протеиновых (-SH) групп определяли флуоресцентным методом с использованием офталевого диальдегида. При этом глутатион GSH определяли после осаждения белков трихлоруксусной кислотой. Концентрацию протеиновых SH-групп нормировали на концентрацию белка и выражали в нмоль SH-групп / мг белка. Активность глутатионпероксидазы GPx рассчитывали по остатку GSH, введенного в реакционную среду, после ферментативного восстановления H_2O_2 до воды [18], остаточное количество GSH определяли реактивом Элмана [17], активность фермента выражали в (ммоль GSH / мин) / г белка.

Измерение собственной триптофановой флуоресценции белков сыворотки крови проводили по I. Sadowska-Bartosz et al. [19, 20] В 96-луночных микропланшетах при $\lambda_{возб} = 296$ нм и $\lambda_{эмис} = 340$

нм, значения выражали в относительных единицах и нормировали на концентрацию общего белка в сыворотке.

Конечные продукты окисления белков (advanced oxidation protein products, AOPP) определяли [21] методом окисления I^- -ионов конечными продуктами окисления белков до I_2 в кислой среде при 340 нм (калибровка — на основе хлорамина-T).

Определение ТБК-продуктов (TBARS) в сыворотке крови проводили методом с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК). 2-ТБК, в кислой среде и при высокой температуре (90–100°C), реагируя с диальдегидами, образует окрашенный триметиновый комплекс [22]. Комплекс селективно экстрагируется смесью бутанол:пиридин (15:1 по объемам). Интенсивность окраски триметин-содержащей фазы определяется на длине волны поглощения 532 нм. Количество ТБК-продуктов рассчитывается на основе калибровочной кривой, построенной на основе 1,1', 3,3'-тетраметоксипропана (Sigma) [23].

Измерения всех биохимических параметров выполнены на планшетном спектрофотометре Tecan Safire² TM (Austria) и на микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 (Tecan Ltd., Swiss) с использованием 96-луночных микропланшетов с использованием программного обеспечения Tecan Magellan (v. 6.6). Первичная обработка результатов спектрофотометрических измерений осуществлялась в программном комплексе Magellan (v. 6.6). Анализ результатов исследования производили с помощью программного продукта Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фотометрия экстрактов. Параметры фотозащиты композиций экстрактов из лишайников, определенные *in vitro*, приведены в табл. 1.

Уровень фотозащиты тестируемых субстанций считается низким при SPF = 2–6; средним — при SPF = 8–12; высоким — при SPF = 15–25; очень высоким — при SPF = 30–50; сверхвысоким — при SPF > 50. По этому показателю созданные нами композиции экстрактов из лишайников обладали высокой и очень высокой фотозащитностью. Известно, что субстанции с $\lambda_{крит} > 370$ нм и SPF > 15,0 признаются солнцезащитными [12].

Все созданные композиции экстрактов из лишайников близки к уровню солнцезащитности, но не являются таковыми по причине ширины размаха выборки полученных данных. Показатель

Таблица 1. Фотозащитные свойства комбинаций и композиций экстрактов из лишайников**Table 1.** Photoprotective properties of combinations and compositions of extracts from lichens

Номер композиции	SPF	$\lambda_{\text{крп}}$, нм	УФ-А/УФ-Б
5 метан. <i>H. physodes</i> + метан. <i>C. arbuscula</i> + масло	35.1 ± 3.18	362.8 ± 7.25	0.69 ± 0.075
6 бенз. <i>E. prunastri</i> + этанол. <i>C. arbuscula</i> + масло	40.7 ± 5.24	364.4 ± 6.57	0.81 ± 0.068
1 метан. <i>H. physodes</i> + метан. <i>C. arbuscula</i>	32.2 ± 2.58	368.2 ± 5.43	0.81 ± 0.095
8 этанол. <i>H. physodes</i> + бенз. <i>R. pollinaria</i> + масло	32.3 ± 2.91	368.7 ± 6.98	1.27 ± 0.103
2 бенз. <i>E. prunastri</i> + этанол. <i>C. arbuscula</i>	40.4 ± 3.97	369.6 ± 6.39	0.98 ± 0.107
4 этанол. <i>H. physodes</i> + бенз. <i>R. pollinaria</i>	27.9 ± 2.82	371.3 ± 6.95	1.19 ± 0.098
7 этила. <i>C. arbuscula</i> + метан. <i>R. pollinaria</i> + масло	35.4 ± 4.36	374.8 ± 5.49	1.06 ± 0.084
3 этила. <i>C. arbuscula</i> + метан. <i>R. pollinaria</i>	33.5 ± 3.88	377.4 ± 8.39	1.41 ± 0.111

УФ-А/УФ-Б является мерой широты защитных свойств. По величине УФ-А/УФ-Б солнцезащитные средства делятся на слабые (0–0.2); средние (0.2–0.4); хорошие (0.4–0.6); превосходные (0.6–0.8) и максимальные (≥ 0.8) [24]. Используемые в экспериментах *in vivo* композиции экстрактов из лишайников близки по степени эффекта и проявляют по данному параметру максимальную фотопротекцию.

Морфометрия состояния кожи. В сериях предварительных экспериментов на мышах линии Af установлено, что минимальная эритемная доза достигается при облучении продолжительностью 2.5 мин, при этом последствия исчезают через 7–8 дней после воздействия. Выраженные ожоги кожи наблюдаются на 3–4-е сутки, начиная с 10 мин облучения. Аналогично оценивали влияние времени облучения и после нанесения этанола. Существенного вклада этанола в степень тяжести ожога в разные сроки после облучения и при разных режимах облучения не выявлено. На основе проведенных исследований было выбрано оптимальное время облучения — 20 мин, так как при этом на 3–4-е сутки после воздействия не образуются чрезмерно сильные ожоги кожи, а процессы восстановления развиваются в течение 2–3 нед.

Одновременно оценивали реакцию кожи мышей на УФ-облучение при ее обработке 30%- и 70%-ным растворами касторового масла в этаноле. В этом случае в течение суток после 2.5 мин облучения ожоговые симптомы отсутствовали, а начиная с 10 мин, продолжались вплоть до 12–14 сут при обеих концентрациях масла с постепенным спадом ожоговых проявлений. Наиболее выраженные ожоги наблюдали на 7-е сутки при 15–20

мин облучения при обработке 70%-ным раствором касторового масла; при облучении с обработкой 30%-ным раствором масла восстановление кожи начиналось заметно раньше.

Данную шкалу (по Adachi T., Satou Y.) далее не применяли, так как она не позволяет точно оценивать ожоговую картину. Поэтому на основании ранее проведенных исследований и предварительных экспериментов настоящей работы [25–29] нами разработана расширенная 10-балльная шкала оценки тяжести УФ-ожога с учетом различных переходных и промежуточных фаз (методика патентуется), по которой мы далее и оценивали фотозащитную эффективность композиций лишайниковых экстрактов из *in vivo*.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФОТОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИШАЙНИКОВЫХ КОМПОЗИЦИЙ

Этанол. Перед оценкой тестируемых субстанций было оценено влияние этанола на кожу при облучении. На 4-е сутки после УФ-воздействия без аппликаций этанола у мышей наблюдали неравномерные ожоги кожи спины. Установлено значимое превышение толщины кожной складки и массы кожных дисков в 1.4–1.5 раза, наблюдали умеренно выраженные признаки ожога — отек кожи, эритему, образование струпа. По тяжести ожога различия значимо превышали контроль в 4.26 раза (табл. 2). Совокупная оценка состояния кожи после УФ-воздействия с аппликацией этанола не показала существенных различий с облучением без аппликаций.

На 11-е сутки после облучения без аппликаций наблюдаемые превышения толщины кожи были еще более выраженными (в 1.56–1.74 раза)

Таблица 2. Состояние кожи на 4-е и 11-е сутки после нанесения этанола и УФ-облучения

Table 2. Skin condition on days 4 and 11 after application of ethanol and UV irradiation

Группа	4-е сутки			11-е сутки		
	кожная складка, мм	масса дисков, мг	тяжесть ожога, балл	кожная складка, мм	масса дисков, мг	тяжесть ожога, балл
Контроль	0.75 ±0.07	127.43 ±23.09	1.29 ±0.49	0.94 ±0.05	154.65 ±11.28	1.50 ±0.58
УФ	1.07* ±0.08	186.73* ±21.52	5.43* ±0.53	1.47* ±0.22	269.14* ±39.48	7.00* ±1.73
Этанол + УФ	1.11* ±0.16	200.84* ±47.53	5.00* ±1.26	1.60* ±0.23	261.88* ±33.53	7.13* ±2.03

* Статистически значимые различия с контролем (при $p < 0,05$).

по сравнению с контролем. По тяжести ожога различия значимо превышали контроль в 4.67 раза. При аппликации этанола на 11-е сутки кардинальных различий с УФ-облучением без аппликаций по всем данным параметрам обнаружено не было.

Этанольные композиции. После анализа свойств этанола были исследованы фотозащитные свойства этанольных растворов комбинаций лишайниковых экстрактов; морфометрическая оценка состояния кожи представлена на рис. 1.

Концентрация 0,2 г/л, как и сами комбинации, была подобрана на основании исследований *in vitro*. На 4-е сутки после нанесения этанольных композиций и УФ-экспозиции статистически значимых различий по толщине кожной складки между группами не отмечали; по массе кожных дисков наблюдали тенденцию к повышению для

композиций № 2–№ 4 (♀), а по тяжести ожога значимых различий с “Этанол +УФ” не отметили ни у одной из композиций. У самцов, за исключением композиции № 2 (масса дисков значимо снижена), также развивался отек при отсутствии выраженного струпа. Отек тесно не связан с внешней ожоговой картиной и поэтому должен рассматриваться только в сочетании с ней.

Для композиций № 2–№ 4 (♂) величина тяжести ожога статистически значимо указывала на явный защитный эффект и выражалась в сохранении относительной эластичности кожи и снижении ее воспаленности, наиболее выраженном для композиции № 2.

В целом по тяжести ожога положительную фотозащитную тенденцию проявили три этанольные композиции: № 3 (♀) и № 2–№ 4 (♂) —

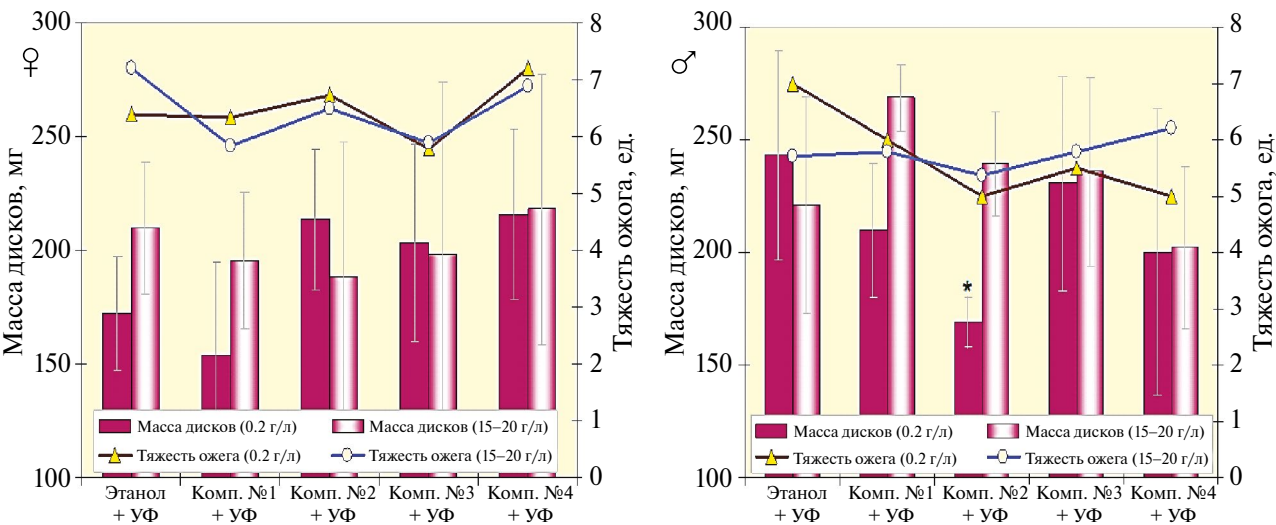


Рис. 1. Морфометрические показатели кожи мышей линии Af на 4-е сутки после УФ-облучения при профилактическом нанесении этанольных лишайниковых композиций в концентрациях 0.2 и 15–20 г/л.
* Статистически значимые различия с “Этанол +УФ” (при $p < 0,05$).
Fig. 1. Morphometric parameters of the skin of Af mice on the 4th day after UV irradiation with prophylactic application of ethanol lichen compositions at concentrations of 0.2 and 15–20 g/l.
* Statistically significant differences with “Ethanol + UV” (at $p < 0.05$).

при различиях по степени отека тяжесть ожога по 10-балльной шкале у них составила 5–6 баллов.

В эксперименте при концентрации 15–20 г/л у самок толщина кожи не претерпела заметных изменений; у самцов также не было значимых различий между группами по данным параметрам, но было отмечено снижение толщины кожной складки в ряду композиций № 1–4 с минимумом для № 4 (в 1.2 раза меньше группы “Этанол +УФ”).

Сравнение групп по тяжести ожога так же не показало значимых различий между группами. У самцов ее минимум отмечен для композиции № 2 (5–5.5 балла), у самок — для композиций № 1 и № 3 (величины по ним совпадают у обоих полов — 5.8–6 баллов). В отличие от складки и дисков это в большей степени отражало их фотозащитный эффект.

Сравнение массы кожных дисков при 0.2 г/л и 15–20 г/л (как у ♀, так и ♂) не показало четкой тенденции как при сравнении композиций между собой, так и с соответствующим УФ-контролем. В отличие от толщины кожной складки и массы дисков, при концентрации 15–20 г/л у самок по величинам тяжести ожога для композиций во многом сохранялась тенденция, наблюдаемая при концентрации 0.2 г/л, а наименее существенные различия между концентрациями были для композиций № 2–№ 4 (рис. 1).

В меньшей степени схожая картина по тяжести ожога и по тенденции у самцов наблюдалась для композиций № 1–3. В итоге, по состоянию кожи при УФ-облучении, среди этанольных композиций наибольшую стабильность и выраженность фотозащитного эффекта показали составы № 2 и № 3.

Этанольно-касторовые растворы. На 4-е сутки после УФ-воздействия без аппликаций у мышей наблюдали ожоги кожи спины. Толщина кожи превысила контрольный на 16%, а массы кожных дисков на 43% — статистически незначимо, тогда как по тяжести ожога с умеренно выраженными его признаками (отеком, эритемой, струпом) различия существенно превышали контроль в 4.26 раза. Совокупная оценка кожи с аппликацией 30%-ного раствора касторового масла в этаноле не показала существенных различий с облучением без аппликаций; по тяжести ожога различия с контролем увеличились до 5.26 раз (табл. 3). При аппликации 70%-ного раствора масла и УФ-облучении показатели отека (толщина складки и масса дисков) не имели статистически значимых различий с таковыми в остальных группах. При УФ-облучении на фоне аппликаций 30%-го и 70%-го раствора касторового масла тяжесть ожога так же существенно превышала уровень интактного контроля в 5–6 раз, но значимо не отличалась от таковой при облучении без аппликаций.

По мере развития ожоговой симптоматики на 11-е сутки после УФ-воздействия во всех облученных группах возросла толщина кожи в среднем на 43% (к уровню 4-х суток) и на 76% относительно контроля. Аналогичное происходило и с массой кожных дисков. Несмотря на заметное повышение данных параметров ожоговая картина во всех облученных группах указывает на явное восстановление кожи: тяжесть ожога снизилась в среднем на 40%.

Сравнивая результаты облучения на фоне аппликаций этанола либо этанольно-касторовых растворов, еще раз отметим, что в обоих случаях между облученными группами по всем параметрам кожи не было статистически значимых различий.

Таблица 3. Состояние кожи на 4-е и 11-е сутки после нанесения растворов касторового масла в этаноле и УФ-облучения

Table 3. Skin condition on days 4 and 11 after applying solutions of castor oil in ethanol and UV irradiation

Группа	4-е сутки			11-е сутки		
	кожная складка, мм	масса дисков, мг	тяжесть ожога, балл	кожная складка, мм	масса дисков, мг	тяжесть ожога, балл
Контроль	0.78 ± 0.04	124.67 ± 16.05	1.33 ± 0.52	0.75 ± 0.06	125.00 ± 8.08	1.33 ± 0.52
УФ	0.91 ± 0.18	178.43 ± 48.11	5.67* ± 0.58	1.47* ± 0.22	260.67* ± 35.59	4.31* ± 1.67
30% кастор. масла в этаноле +УФ	0.94 ± 0.14	145.07 ± 17.65	7.00* ± 1.15	1.23* ± 0.19	197.06* ± 28.89	4.31* ± 1.67
70% кастор. масла в этаноле +УФ	0.91 ± 0.15	157.50 ± 37.36	6.64* ± 1.07	1.26* ± 0.22	201.70* ± 43.72	5.19* ± 0.92

* Статистически значимые различия с контролем (при $p < 0,05$).

Введение 30%-ной касторки в этанол принципиально не влияет на тяжесть поражения кожи при УФ-облучении по сравнению с абсолютным контролем и с аппликацией этанола на кожу. Это позволяет использовать этанольно-касторовые растворы, как и сам этанол, для изучения фотозащитных свойств аппликаций лишайниковых экстрактов.

Этанольно-касторовые композиции. После анализа свойств этанола были исследованы фотозащитные свойства этанольно-касторовых растворов комбинаций лишайниковых экстрактов; морфометрическая оценка состояния кожи представлена на рис. 2.

После нанесения этанольно-касторовых композиций (0.2 г/л) и 20 мин УФ-экспозиции по морфометрическим параметрам у самок различий с УФ-контролем не отмечено — по тяжести ожога композиции имели 6–7 баллов. У самцов по тем же параметрам так же не было заметных различий между всеми облученными группами, а наименьшая тяжесть ожога отмечена для композиций № 5, № 7 и № 8 (5–6 баллов). В целом же по данному опыту по сумме параметров лучшие результаты показала композиция № 8.

В эксперименте при концентрации 15–20 г/л у самок статистически значимых различий по толщине кожной складки и по массе дисков между группами не отмечено. У самцов в большинстве

случаев также не было значимых различий с группой “30%-ного касторового масла в этаноле +УФ”, за исключением композиции № 6, где масса дисков была статистически значимо снижена и имела, как и тяжесть ожога, наименьшую величину в данном эксперименте (6 баллов). Для композиций № 5 и № 7 данные параметры имели практически схожие значения.

Сопоставление УФ-эффектов на протяжении всей серии экспериментов при всех вариантах оценки тестируемых лишайниковых комбинаций показало второстепенное значение величины толщины кожной складки и массы дисков на фоне визуальной ожоговой картины. Так, при нанесении этанольных растворов (0.2 г/л) и УФ-экспозиции по тяжести ожога положительную фотозащитную тенденцию (5–6 баллов) проявили 3 комбинации экстрактов в составе композиций: а) № 3 (♀) и № 2–№ 4(♂). При концентрации 15–20 г/л у самок такая тенденция сохранялась, у самцов наименьшая тяжесть ожога отмечена для композиций № 2 (3 балла).

Нанесение этанольно-касторовых растворов экстрактов (0.2 г/л) у самок значимо не влияло на тяжесть ожога, в то время как у самцов композиции № 7–№ 8 снизили ее до 5–6 баллов. Увеличение концентрации до 15–20 г/л не повлияло на степень фотозащитного эффекта у самок; у самцов при этом лучший результат от-

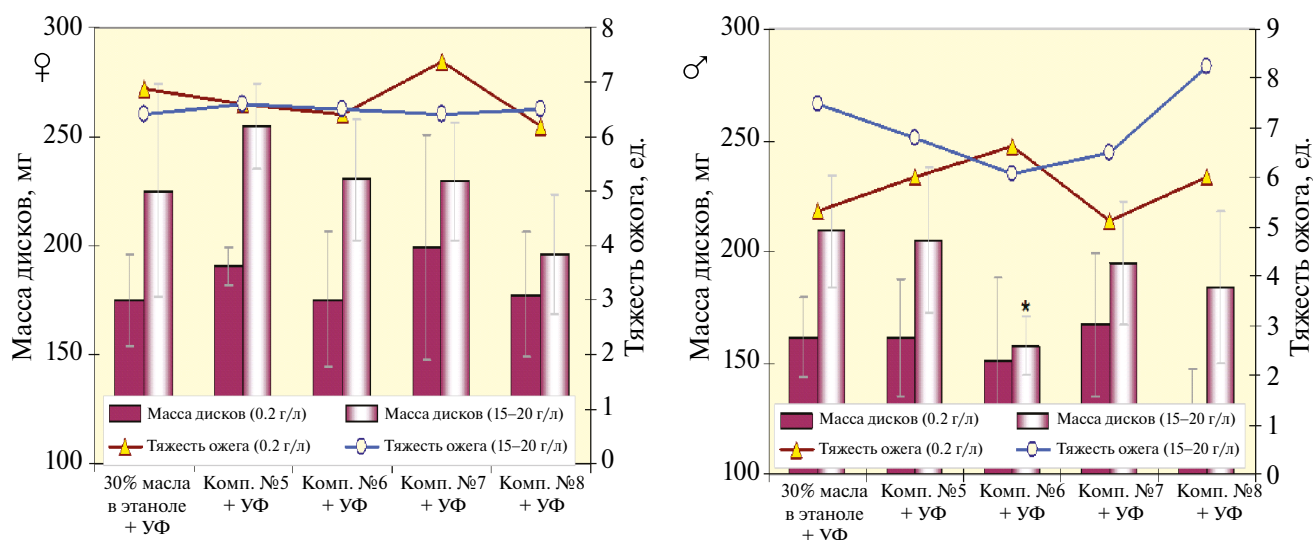


Рис. 2. Морфометрические показатели кожи мышей линии Af на 4-е сутки после УФ-облучения при профилактическом нанесении этанольно-касторовых лишайниковых композиций в концентрациях 0.2 и 15–20 г/л.

* Статистически значимые различия с “30% кастор. масла в этаноле +УФ” (при $p < 0.05$).

Fig. 2. Morphometric parameters of the skin of Af mice on the 4th day after UV irradiation with the prophylactic application of ethanol-castor lichen compositions at concentrations of 0.2 and 15–20 g/l.

* Statistically significant differences with “30% castor oil in ethanol + UV” (at $p < 0.05$).

мечен для композиции № 6 (6 баллов). Введение касторового масла в этанольные композиции в целом несколько ухудшило их фотозащитные свойства — по совокупной оценке (включая пол мышей, концентрацию) суммарная тяжесть ожога на 6,5–10,5% выше таковой при отсутствии масла. Нестабильность наблюдаемых эффектов мы связываем с низкой максимально достигнутой концентрацией экстрактов лишайников, соответствующей 1,5–2%; а выраженные фотозащитные эффекты, полученные ранее [25–28] для растворов сухих экстрактов в диметилсульфоксиде, имели место при концентрации от 5%.

Будет справедливым отметить, что концентрация 0,2 г/л не настолько мала, так как это уже не масса сухого лишайника, а количество сухих растворимых вторичных метаболитов, которых, как известно, в их талломах очень много. Тем не менее, среди четырех испытуемых комбинаций по сумме величин тяжести ожога во всей серии экспериментов фотозащитный потенциал проявили две комбинации экстрактов:

- бензольный экстракт *E. prunastri* + этанольный экстракт *C. arbuscula*.
- этилацетатный экстракт *C. arbuscula* + метанольный экстракт *R. pollinaria*.

Последняя комбинация показала наиболее выраженный фотозащитный эффект.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФОТОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛИШАЙНИКОВЫХ КОМПОЗИЦИЙ

Этанол. Анализ биохимических параметров сыворотки крови (рис. 3) показал понижение уровня белка при облучении как с аппликацией этанола, так и без. Его снижение на 10–17% было статистически значимым. При этом в обоих случаях не было существенных сдвигов уровня альбумина.

Одновременно с общим белком в обеих группах снизились величины некоторых антиоксидантных параметров: концентрация GSH 15–20% и ТАОС на ~25%. По обоим параметрам статистически значимые различия с контролем были в группе “Этанол + УФ”. Уровень протеиновых SH-групп понизился незначительно. Снижение значений данных параметров после УФ-облучения очевидно и очередной раз указывает на развитие окислительного стресса. Аппликации этанола заметно не модифицировало данные эффекты. В противовес этим параметрам в обеих группах логично и заметно выросли уровни прооксидантных параметров: конечных продуктов окисления белков AOPP (на 14 и 31%), сероводорода (на 17 и 25%) и TBARS (на 22 и 34%). При этом данные параметры были снижены в группе “Этанол + УФ” в большей мере, хотя и статистически незначимо. В этой же группе отмечено и небольшое, но значимое снижение триптофановой флуоресценции.

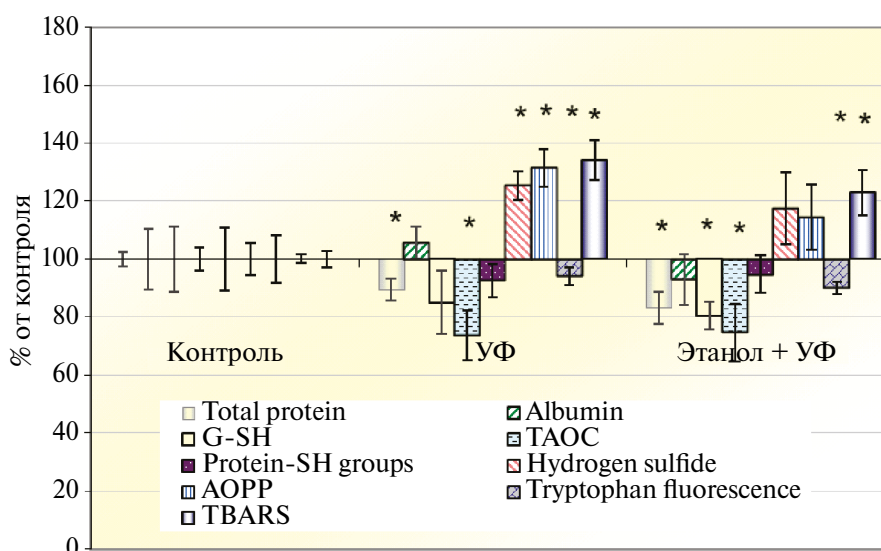


Рис. 3. Антиоксидантные параметры и маркеры окислительной модификации протеинов в сыворотке крови на 4-е сутки после нанесения этанола и УФ-облучения (в % от контроля).

* Статистически значимые различия с контролем (при $p < 0.05$).

Fig. 3. Antioxidant parameters and markers of oxidative modification of proteins in blood serum on the 4th day after application of ethanol and UV irradiation (% of control).

* Statistically significant differences with control (at $p < 0.05$).

В целом по совокупности параметров, имеющих статистически значимые различия с контролем, обе облученные группы относительно равноценны. Кроме того, по всем анализируемым показателям сыворотки эти группы между собой таковых различий не имеют. В целом можно считать, что в биохимическом плане аппликации этанола не оказывают существенной модификации на эффекты УФ-воздействия, а по совокупности биохимических и морфометрических параметров

этанол может быть применен в дальнейшем как основа для топических аппликаций экстрактов лишайников и их композиций.

Этанольные композиции. Половые различия, отмеченные для указанных морфометрических показателей, наблюдались и при анализе биохимических параметров сыворотки крови. Опыт на самках показал падение уровня ТАОС во всех группах относительно группы “Этанол +УФ” (рис. 4) на 15–32%.

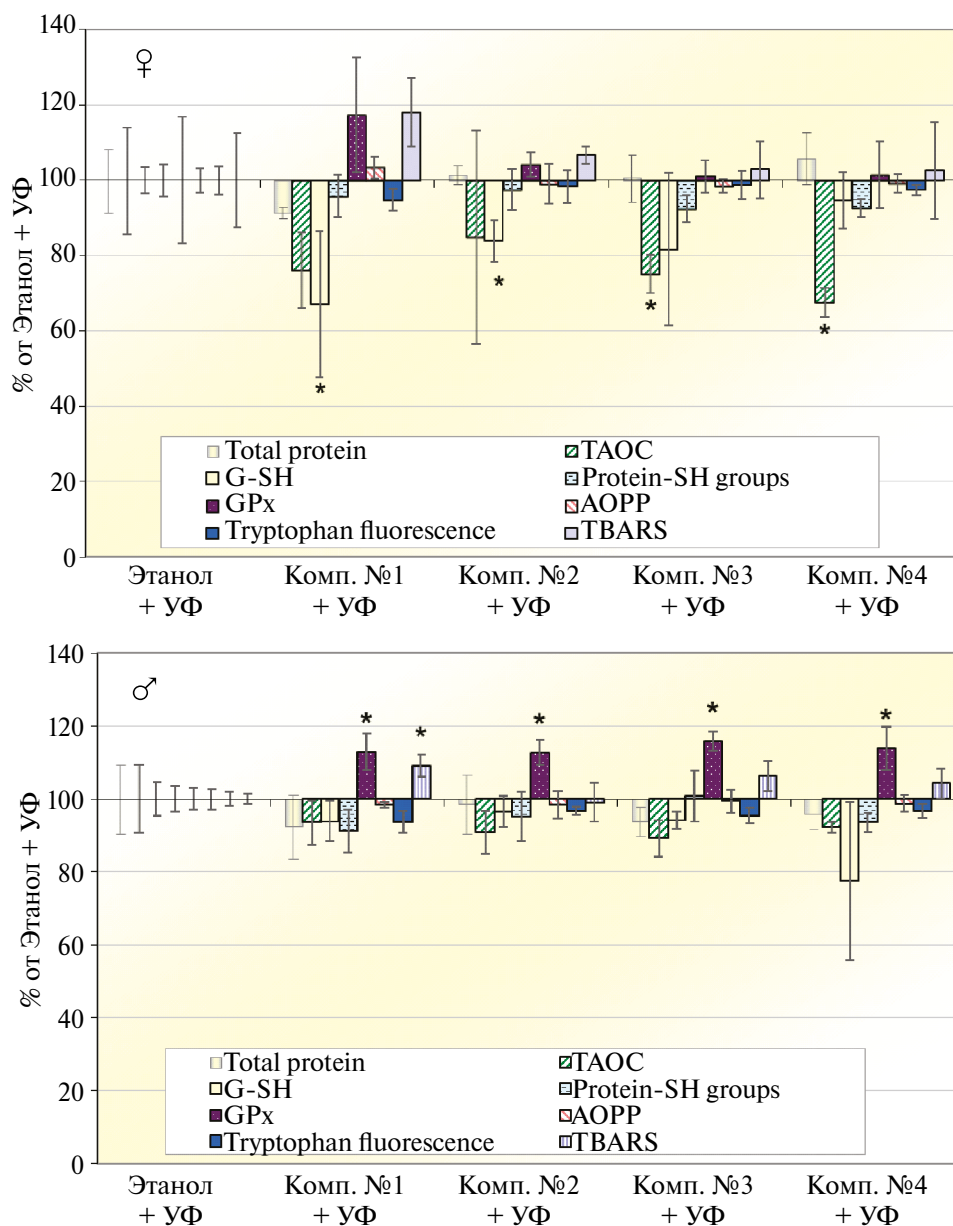


Рис. 4. Антиоксидантные параметры и маркеры окислительной модификации протеинов в сыворотке крови на 4-е сутки после нанесения этанольных композиций из лишайниковых экстрактов (0.2 г/л) и УФ-облучения.

* Статистически значимые различия с “Этанол +УФ” (при $p < 0.05$).

Fig. 4. Antioxidant parameters and markers of oxidative modification of proteins in blood serum on the 4th day after application of ethanol compositions from lichen extracts (0.2 g/l) and UV irradiation.

* Statistically significant differences with “Ethanol + UV” (at $p < 0.05$).

Наиболее выражено и статистически значимо это происходило в случае использования композиций № 3 и № 4. У самцов в этом плане тенденция была схожая, но различия с группой “Этанол + УФ” были несущественными и незначимыми. То же относится и к общему белку и уровню протеиновых SH-групп, уровень которых так же существенно не изменялся ни у самцов, ни у самок. Для всех композиций у обоих полов изменения почти не коснулись ни триптофановой флуоресценции, ни AOPP.

Помимо снижения ТАОС, для композиций № 1–№ 3 наблюдали снижение уровня GSH у самок на 33, 16 и 18,5% соответственно; статистически значимые различия имели место для композиций № 1 и № 2. У самцов в этом плане существенных сдвигов, кроме композиции № 4 (снижение на 22,5%), не зафиксировано.

Весьма серьезные половые различия отмечены при анализе активности GPx. Если у самок существенных и значимых сдвигов практически по всем композициям мы не отметили, то у самцов активность GPx статистически значимо превысила уровень группы “Этанол + УФ” на 13–15%, причем для всех композиций.

Активность GPx в живых клетках увеличивается при окислительном стрессе, действии γ -излучения

и др. Стоит отметить композицию № 1: и у самцов, и у самок по активности GPx и TBARS очень схожие тенденции — у самок прирост по этим параметрам составил 17 и 18% соответственно (статистически незначимо), у самцов 13 и 9% (статистически значимо). В итоге композиция № 1 при 0,2 г/л по совокупности биохимии крови и морфометрии кожи показала наименьший фотозащитный потенциал. Сопоставление морфометрических показателей кожи и биохимических параметров сыворотки показало слабую связь между ними у самок (по ТАОС и GSH), у самцов эта связь была более тесная (по GPx).

Этанольно-каستоровые композиции. Анализ биохимических параметров сыворотки крови, в отличие от опыта с облучением на фоне аппликаций этанола (рис. 3), не показал в данном случае понижения уровня белка при всех вариантах облучения (рис. 5); как было показано ранее, этого не происходило и при аппликациях этанольных композиций. Так как уровень альбумина ранее значимо не менялся, как и уровень белка в данном случае в группе “УФ”, то вопрос о снижении общего белка при облучении пока остается открытым. Многие биохимические параметры сохранили ту же тенденцию — снижение ТАОС, GSH, повы-

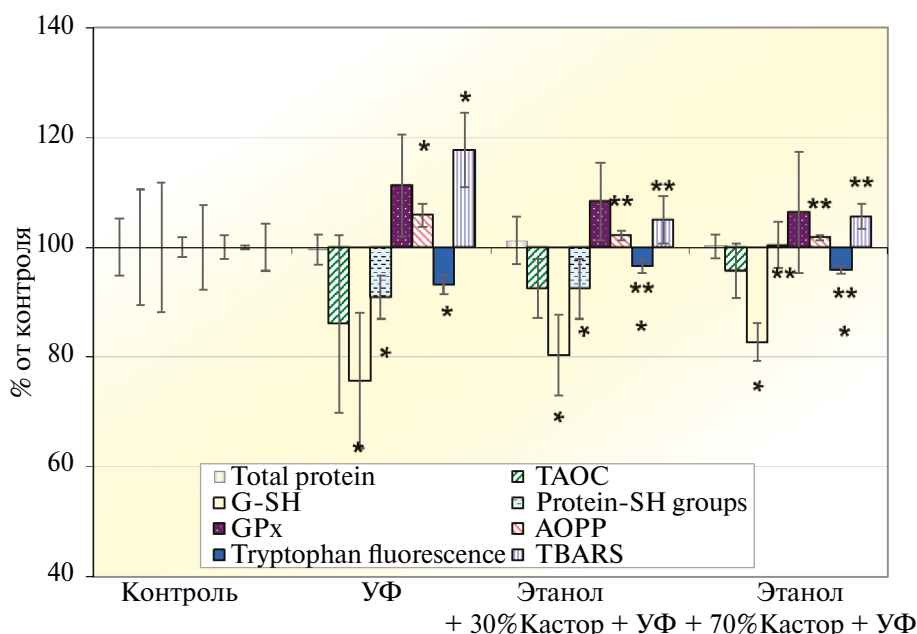


Рис. 5. Антиоксидантные параметры и маркеры окислительной модификации протеинов в сыворотке крови на 4-е сутки после нанесения растворов касторового масла в этаноле и УФ-облучения (в % от контроля).

* Статистически значимые различия с контролем (при $p < 0.05$), ** статистически значимые различия с “УФ” (при $p < 0.05$).

Fig. 5. Antioxidant parameters and markers of oxidative modification of proteins in blood serum on the 4th day after applying solutions of castor oil in ethanol and UV irradiation (% of control).

* Statistically significant differences with control (at $p < 0.05$), ** statistically significant differences with “UV” (at $p < 0.05$).

шение GPx, TBARS, AOPP — и являются более надежными для оценки фотозащитного эффекта.

Концентрация GSH статистически значимо относительно контроля снизилась при всех вариантах облучения: на 25, 20 и 18%. В значительно меньшей степени, статистически незначимо, но с той же тенденцией это происходило и для ТАОС — на ~14, 8 и 5%. По обоим параметрам между группами “Касторовое масло в этаноле +УФ” не было статистически значимых различий с группой “УФ”. А вот небольшое, но значимое снижение триптофановой флуоресценции в тех же группах таковые имело (в том числе относительно контроля): в группе “УФ” — 7%, в группах “Касторовое масло в этаноле +УФ” — 3–4%. В несколько иных пропорциях схожая картина отмечена и для протеиновых SH-групп, уровень которых в группах “УФ” и “30% кастор. масла в этаноле +УФ” статистически значимо понизился относительно контроля, а при 70% касторового масла полностью сошел на нет.

Небольшое повышение активности GPx во всех облученных группах не было значимым. В то же время AOPP и TBARS в группе “УФ” статистически значимо поднялись, а в группах “Касторовое масло в этаноле +УФ” их величины значимо снизились втрое.

В целом, практически по всем анализируемым показателям сыворотки группы с этанольно-касторовыми аппликациями между собой значимых различий не имеют и по совокупности параметров кожи и крови между собой относительно равновалены. А вот их статистически значимые различия с группой “УФ” по ряду показателей — триптофановой флуоресценции, AOPP и TBARS — в данном опыте очевидны. В итоге, в биохимическом плане растворы касторового масла в этаноле по одним параметрам, не модифицируют УФ-воздействия, по другим — существенно их нивелируют. Как и этанол, по совокупности биохимических и морфометрических параметров они могут быть применены в дальнейшем как основа для топических аппликаций экстрактов лишайников и их композиций.

Анализ биохимических параметров сыворотки крови (рис. 6), как и в случае этанольных композиций, для этанольно-касторовых композиций в целом не показал дальнейшего понижения уровня белка относительно группы “30% кастор. масла в этаноле +УФ”. Исключением стала композиция № 6 у самок — хотя величина и составляла около 10%, его снижение было значимым.

Говоря о триптофановой флуоресценции, ее уровни были довольно схожи у самцов и самок как по тенденции (снижение), так и количественно. Несмотря на относительно небольшие величины (всего 2–4%), у самцов для всех этанольно-касторовых композиций оно было статистически значимым. Схожая картина наблюдалась и для этанольных композиций, однако без значимых различий с соответствующим контролем. Половые различия в данном эксперименте коснулись также протеиновых SH-групп и AOPP. Так, у самок для всех этанольно-касторовых композиций уровень протеиновых SH-групп снижался, причем для композиций № 6–№ 8 заметно (на 10–14%) и статистически значимо; у самцов этот параметр не менялся. Рост уровня AOPP у самцов происходил статистически значимо во всех случаях, но в сравнении с триптофановой флуоресценцией был повышен втрое; у самок по направленности и количественно эффект имел противоположный характер.

Остальные параметры не имели половых различий по направленности эффекта, а лишь количественно. Концентрация GSH снизилась у самцов статистически значимо относительно контроля для всех композиций, однако для композиций № 7 и № 8 это не носило выраженного характера (в отличие от № 5 и № 6 — на 12–13%). У самок статистически значимое снижение GSH происходило для композиций № 6 и № 7 (на 21–26%). В противовес этому (независимо от пола) активность GPx возросла во всех группах. Сильней всего это происходило для композиции № 5 (значимо на ~25%), а наименее заметно — для № 7 (незначимо до 10%).

Как и GSH, у самцов для всех композиций статистически значимо снизился уровень ТАОС: в наибольшей степени для композиций № 5 — на 27%, в остальных случаях снижение составляло не более 12–17%. В опыте на самках падение уровня ТАОС во всех группах составило 8–14%; статистически различия имели место для композиций № 5 и № 7.

Подобную активности GPx тенденцию независимо от пола показал и уровень TBARS и во многом имел схожую с ней картину эффекта: возрастал во всех группах и почти везде статистически значимо. Сильней всего это происходило для композиции № 5 (на 16–40%), в наименьшей степени — для № 7 (6–10%). В итоге композиция № 5 при концентрации 0,2 г/л по совокупности биохимии крови и морфометрии кожи не только не оказала фотозащиты, но и показала свою токсичность в качестве модификатора УФ-облучения.

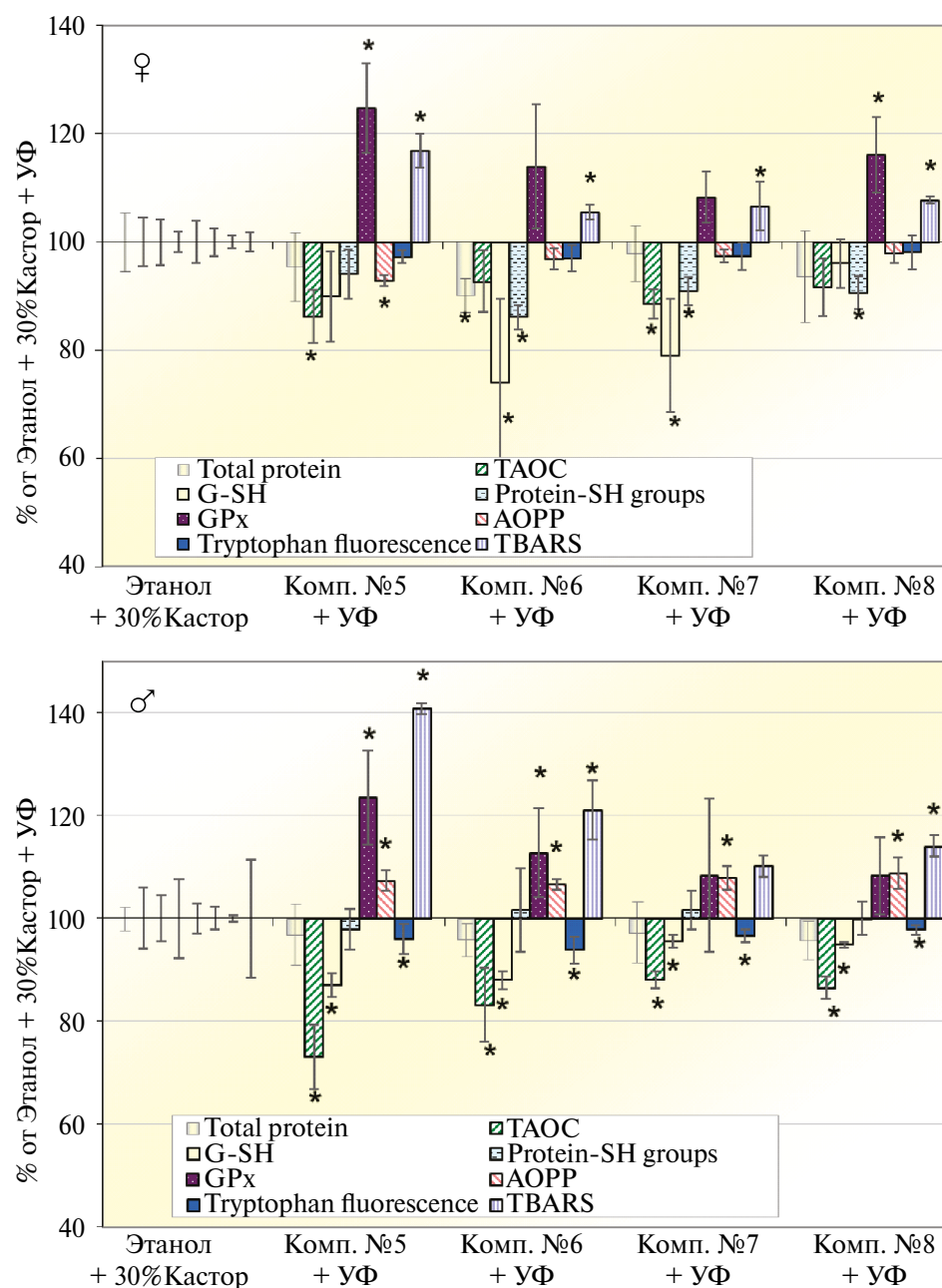


Рис. 6. Антиоксидантные параметры и маркеры окислительной модификации протеинов в сыворотке крови на 4-е сутки после нанесения этанольно-касторовых композиций из лишайниковых экстрактов (0.2 г/л) и УФ-облучения.

* Статистически значимые различия с “Этанол + УФ” (при $p < 0.05$).

Fig. 6. Antioxidant parameters and markers of oxidative modification of proteins in blood serum on the 4th day after application of ethanol-castor compositions from lichen extracts (0.2 g/l) and UV irradiation.

* Statistically significant differences with “Ethanol + UV” (at $p < 0.05$).

Следует отметить, что биохимические параметры сыворотки крови гораздо более изменчивы, чем морфометрические; в результате последние значительно запаздывают. Поэтому при корреляционном анализе возможны нестыковки между этими типами параметров по направленности и выраженности фотозащитного эффекта, расхождений по полу, особенно при низких концен-

трациях экстрактов в композициях. Кроме того, в крови одновременно и в разных пропорциях присутствуют метаболиты как индуцированные УФ-ожогом, так и способствующие его либо развитию, либо заживлению. В биохимическом плане корректно оценить данные эффекты помогают параметры индуцибельные, с устойчивой тенденцией и не зависящие от пола. В нашем

случае это активность GPx, TBARS, TAOC, GSH. Итоговый результат по каждому из этих четырех параметров указывал на эффективность трех комбинаций экстрактов лишайников, входящих в состав композиций № 2 и № 6, № 3 и № 7, № 4 и № 8. По совокупности эффектов по всем этим параметрам комбинация метанольных экстрактов *H. physodes* и *C. arbuscula* в составе композиций № 1 и № 5 показала худшие результаты, на основании которых мы предполагаем ее фотосенсибилизирующий характер. А наибольшая эффективность наблюдалась для композиций № 4 и № 8 и, в особенности, для № 3 и № 7. Стабильность направленности эффектов по GPx, TBARS, TAOC, GSH показывает сенсибилизирующий характер комбинаций, а эффективность той или иной композиции при 0.2 г/л скорее говорит о степени ее возможной дерматотропности и токсичности при более высоких концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотометрические исследования в целом показали очень высокий уровень фотозащиты у всех созданных лишайниковых композиций, которые близки друг к другу количественно и приближаются к категории “солнцезащитные средства”. По сочетанию “SPF — $\lambda_{\text{крит}}$ — УФ-А/УФ-Б” наибольший фотозащитный эффект отмечен у композиций на основе комбинации экстрактов “этилацетатный *C. arbuscula* + метанольный *R. pollinaria*”.

По биохимическим и морфометрическим параметрам этанол и 30%-ный раствор касторового масла в этаноле не оказывают заметного модифицирующего влияния на действие УФ на кожу и сыворотку крови и могут применяться для топических аппликаций лишайниковых экстрактов.

Среди испытуемых этанольных композиций экстрактов во всей серии экспериментов в концентрациях 0.2 и 15–20 г/л по сумме величин тяжести ожога при 20 мин УФ-облучения наибольший фотозащитный эффект проявили комбинации экстрактов “этилацетатный *C. arbuscula* + метанольный *R. pollinaria*” и “бензольный *E. prunastri* + этанольный *C. arbuscula*” (5–6 баллов по 10-балльной шкале). Данные комбинации экстрактов схожим образом работали и в этанольно-касторовых композициях, где показали менее стабильный фотозащитный эффект. Введение касторового масла в этанол по совокупности значений повышало тяжесть ожога на 6.5–10.5% для всех комбинаций экстрактов.

Совокупность УФ-эффектов по биохимическим параметрам, проявляющим четкую направленность (GPx, TBARS, TAOC, GSH), показывает фотосенсибилизирующий характер всех лишайниковых композиций в концентрации 0.2 г/л. В наибольшей степени это наблюдалось для комбинации метанольных экстрактов *H. physodes* и *C. arbuscula*. Наименьшая фотосенсибилизация отмечена для комбинации экстрактов “этилацетатный *C. arbuscula* + метанольный *R. pollinaria*”, которая в составе разных композиций и по совокупности фотометрических, биохимических и морфометрических параметров проявила наиболее выраженные фотопротекторные свойства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проект финансировался в рамках выполнения задания 3.04 “Исследование фотопротекторной активности лишайниковых веществ” Госпрограммы научных исследований Республики Беларусь “Природопользование и экология” 2016–2020 гг. (ГР_20160213)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ball W.T. et al. Evidence for a continuous decline in lower stratospheric ozone offsetting ozone layer recovery. *Atmos. Chem. Phys.* 2018;18(2):1379–1394. <https://doi.org/10.5194/acp-18-1379-2018>
2. Заридзе Д.Г., Максимович Д.М. Профилактика злокачественных новообразований. *Успехи молек. онкол.* 2017;4(2):8–25. [Zaridze D.G. Maksimovich D.M., Profilaktika zlokachestvennykh novoobrazovaniy = Prevention of malignant neoplasms. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2017;4(2):8–25. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2017-4-2-8-25>
3. Снарская Е.С. Фотоканцерогенез и профилактика рака кожи. *Рос. журн. кож. и венер. болезней.* 2010;5:1010–13. [Snarskaya Ye.S. Fotokantserogenez i profilaktika raka kozhi = Photocarcinogenesis and prevention of skin cancer. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2010;5:10–13. (In Russ.)].
4. Gianeti M.D., Maia Campos P. M., Efficacy Evaluation of a Multifunctional Cosmetic Formulation: The Benefits of a Combination of Active Antioxidant Substances. *Molecules.* 2014;19:18268–18282. <https://doi.org/10.3390/molecules191118268>
5. Gilbert E., Pirot F., Bertholle V. et al. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *Int. J. Cosm. Sci.* 2013;35(3):208–219. <https://doi.org/10.1111/ics.12030>
6. Гвинджилия С.А. и др. Разработка состава солнцезащитного средства с использованием сырья, произрастающего на территории Грузии. *Международ. журн. прикл. и фундамент. исслед.* 2018;11: 248–252. [Gvindzhiliya S.A. i dr. Razrabotka sostava solntsezashchitnogo sredstva s ispol'zovaniyem syr'ya, proizrastayushchego na territorii Gruzii = Development of the composition of a sunscreen using raw materials

- growing in Georgia. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2018;11:248–252. (In Russ.).]
7. Vayalil P.K., Elmets C.A., Katiyar S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*. 2003;4:927–936. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg025>
 8. Naranyanan D.L., Saladi R.N., Fox J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Derm.* 2010;49:978–986. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>
 9. Bino A., Baldissarro A., Scalambra E., Dissette V. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel hydroxy-phenyl-1H-benzimidazoles as radical scavengers and UV-protective agents. *J. Enzyme Inhibit. Med. Chem.* 2017;32(1):527–537. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1265523>
 10. Cvetkovska A.D., Manfredini S., Ziosi P., Molesini S., Dissette V. et al. Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2017;39:310–319. <https://doi.org/10.1111/ics.12377>
 11. Perea S.E. Solar filters: A strategy of photoprotection. *Appl. Photochem.* 2016;92:459–478. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72712>
 12. Храменкова О.М. Фотозащитные свойства экстрактов из пяти видов лишайников. *Изв. Гомель. гос. университета им. Ф. Скорины*. 2018;6(111):81–86. [Khranchenkova O.M., Fotozashchitnaya aktivnost' ekstraktov pyati vidov lishaynikov = Photoprotective properties of extracts from five types of lichens. *Izvestiya Gomeľ'skogo gosudarstvennogo universiteta imeni F. Skoriny*. 2018;6(111):81–86. (In Russ.)]
 13. Adachi T., Satou Y., Satou H., Shibata H., Miwa S. et al. Assessment of 8-methoxypsoralen, lomefloxacin, sparfloxacin and pifendone phototoxicity in Long-Evans rats. *Int. J. Toxicol.* 2015;34(1):16–23. <https://doi.org/10.1177/1091581814559397>
 14. Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50(16):4437–4444. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0201529>
 15. Davalos A., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 2004. 52(1):48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
 16. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т.1. Минск: Беларусь, 2002. 495 с. [Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike = Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics: V 2 t. T.1. Minsk: Belarus', 2002. 495 p. (In Russ.)]
 17. Sedlak K.J., Lindsay R.H. Estimation of total protein bound and non-protein sulfhydryl group in tissues with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25(1):192–205.
 18. Современные проблемы биохимии. Методы исследований / Е.В. Барковский [и др.]; под ред. А.А. Чиркина. Минск: Вышэйшая школа, 2013. С. 187–190. [Sovremennyye problemy biokhimii. Metody issledovaniy = Modern problems of biochemistry. Research methods / Ye.V. Barkovskiy i dr.; pod red. A.A. Chirkina. Minsk: Vysheyschaya shkola, 2013. P. 187–190. (In Russ.)].]
 19. Robaszkiewicz A., Bartosz G., Soszynski M. N-chloroamino acids cause oxidative protein modifications in the erythrocyte membrane. *Mech. Ageing Dev.* 2008;129:572–579. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.05.007>
 20. Sadowska-Bartosz I., Adamczyk-Sowa M., Galiniak S. et al. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochem. Int.* 2013;63(5):507–516. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.08.009>
 21. Taylor E.L., Armstrong K.R., Perrett D. et al. Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, Article ID 496271. 10p. <https://doi.org/10.1155/2015/496271>
 22. Schimke I., Kahl P.E., Romaniuk P., Papies B. Concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum following myocardial infarct. *Klin. Wochenschrift.* 1986;23(64):1237–1239.
 23. Schafner M., Shepard B.M. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances. *Anal. Biochem.* 1984;137(2):269–276.
 24. Rojas J.L., Díaz-Santos M., Valencia-Islas N.A. Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes. *Pharm. Biosci. J.* 2015;3(4):18–26. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/3/i4/89454>
 25. Гончаров С.В., Козлов А.Е., Матвеевков М.В., Чешик И.А. Оценка эффективности защиты от ультрафиолетового излучения экстрактами лишайника *Hypogymnia physodes* в биологических системах in vivo. *Докл. НАН Беларуси*. 2019;63(6):747–754. [Goncharov S.V., Kozlov A.Ye., Matveyenkov M.V., Cheshik I.A. Otsenka effektivnosti zashchity ot ul'trafiol'tovogo izlucheniya ekstraktami lishaynika *Hypogymnia physodes* v biologicheskikh sistemakh in vivo = Evaluation of the efficacy of ultraviolet radiation protection by lichen extracts *Hypogymnia physodes* in biological systems in vivo. *Doklady NAN Belarusi*. 2019;63(6):747–754. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-6-747-754>
 26. Гончаров С.В., Козлов А.Е., Матвеевков М.В., Храменкова О.М. Оценка профилактического действия экстрактов лишайников при воздействии УФ на модели in vivo. В кн.: Биохимия и молекулярная биология. 2019. Вып. 3. Минск: ИВЦ Минфина, 2019. С. 150–155. [Goncharov S.V., Kozlov A.Ye., Matveyenkov M.V., Khranchenkova O.M., Otsenka profilakticheskogo deystviya ekstraktov lishaynikov pri vozdeystvii UF na modeli in vivo = Evaluation of the preventive effect of lichen extracts under UV exposure on in vivo model. In: Biokhimiya i molekulyarnaya biologiya. 2019. Vyp. 3. Minsk: IVTS Minfina, 2019. P. 150–155. (In Russ.)].]
 27. Гончаров С.В., Сушко С.Н., Ноздрев Д.А. и др. Оценка фотопротекторной способности экстрактов лишайников по морфометрическим показателям кожи. В кн.: Радиобиология: актуальные проблемы. Мат. междунар. науч. конф., Гомель, 27–28 сентября 2018. Гомель: БТЭУ ПК, 2018. С. 41–44. [Goncharov S.V., Sushko S.N., Nozdrev D.A. et

- al. Otsenka fotoprotektoynoy sposobnosti ekstraktov lishaynikov po morfometricheskim pokazatelyam kozhi = Assessment of the photoprotective ability of lichen extracts based on skin morphometric parameters. In: Radiobiologiya: aktual'nyye problemy. Mat. mezhd. nauch. konf., Gomel', 27-28 sentyabrya 2018. Gomel': VTEU PK, 2018. P. 41-44. (In Russ.)]
28. Гончаров С.В., Матвеевков М.В., Храмченкова О.М. Фотозащитная способность лишайниковых экстрактов при топических аппликациях на различных носителях. В кн.: Современные проблемы радиационной медицины: от науки к практике. Мат. междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 19 июня 2020. Гомель: РНПЦ РМиЭЧ, 2020. С. 29-31. [Goncharov S.V., Matveyenkov M.V., Khranchenkova O.M. Fotozashchitnaya sposobnost' lishaynikovyykh ekstraktov pri topicheskikh aplikatsiyakh na razlichnykh nositelyakh = Photoprotective ability of lichen extracts for topical applications on various media. In: Sovremennyye problemy radiatsionnoy meditsiny: ot nauki k praktike. Mat. mezhd. nauch.-prakt. konf., Gomel', 19 iyunya 2020. Gomel': RNPTS RMIeCH, 2020. P. 29-31. (In Russ.)]
29. Гончаров С.В., Кадукова Е.М. Оценка модификации кожных эффектов УФ-облучения этанольно-касторовыми композициями у мышей. В кн.: Современные проблемы радиационной медицины: От науки к практике. Мат. междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 29 апреля 2021. Гомель: ГУ РНПЦ РМиЭЧ, 2021. С. 28-30. [Goncharov S.V., Kadukova Ye.M., Otsenka modifikatsii kozhnykh effektiv UV-oblucheniya etanol'no-kastorovymi kompozitsiyami u myshey = Assessment of modifying the skin effects of UV irradiation with ethanol-castor compositions in mice. In: Sovremennyye problemy radiatsionnoy meditsiny: Ot nauki k praktike. Mat. mezhd. nauch.-prakt. konf., Gomel', 29 aprelya 2021. Gomel': GU RNPTS RMIeCH, 2021. P. 28-30. (In Russ.)]

Evaluating *in vitro* and *in vivo* the Photoprotective Effectiveness of Combinations of Lichen Extracts

S. V. Goncharov^{1,*}, V. M. Khranchankova², A. E. Kozlov³

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

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

³*Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus*

*E-mail: combinexpo@gmail.com

In a series of experiments, the photoprotective properties of ethanol and ethanol-castor compositions based on perspective combinations of lichen extracts (1:1) were studied in terms of a set of parameters: 1) SPF, λ_{crit} and UV-A/UV-B — *in vitro*; 2) morphological and functional characteristics of the skin, pro- and antioxidant processes in mice' blood (line Af) after topical application of the compositions and exposure to UV-A/B — *in vivo*. In general, photometric studies showed a very high level of photoprotection in all created lichen compositions, which are close to each other quantitatively and approach the category of "sunscreens". Compositions based on the combination of extracts "ethylacetate *Cladonia arbuscula* + methanol *Ramalina pollinaria*" favorably stand out in terms of the combination "SPF — λ_{crit} — UV-A/UV-B". According to biochemical and morphometric parameters, ethanol and a 30% solution of castor oil in ethanol do not have a noticeable modifying effect on the action of UV on the skin and blood serum and can be used for topical applications of lichen extracts. Among the tested ethanol compositions of extracts in the entire series of experiments at concentrations of 0.2 g/l and 15-20 g/l, according to the sum of the burn severity values at 20 min of UV irradiation, the combinations of extracts "ethylacetate *C. arbuscula* + methanol *R. pollinaria*" and "benzene *Evernia prunastri* + ethanol *C. arbuscula*" have shown the best photoprotective effect (5-6 points on a 10-point scale). These combinations of extracts worked in a similar way in ethanol-castor compositions, where they showed a less stable photoprotective effect. The introduction of castor oil into ethanol increased the severity of the burn by 6.5-10.5% for all combinations of extracts. The summary of UV effects based on biochemical parameters with a clear direction (GPx, TBARS, TAOC, GSH) shows the photosensitizing nature of all lichen compositions at a concentration of 0.2 g/l. This was observed to the greatest extent for the combination of methanol extracts of *Hypogymnia physodes* and *C. arbuscula*. The lowest photosensitivity was noted for the combination of extracts "ethylacetate *C. arbuscula* + methanol *R. pollinaria*", which in various compositions and by the totality of photometric, biochemical and morphometric parameters demonstrated the most expressed photoprotective properties.

Keywords: lichen, ultraviolet, ethanol, castor oil, SPF, photoprotectors, glutathione, TBA products, antioxidant capacity

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гончаров Сергей Васильевич, Goncharov Sergey Vasilievich; combinexpo@gmail.com 0009-0009-4231-6461

Храмченкова Ольга Михайловна, Khranchankova Volha Mikhailauna; hramchenkova@gsu.by 0000-0002-6677-096X

Козлов Александр Евгеньевич, Kozlov Alexander Evgenievich; cozlov.alexander@yandex.ru 0000-0002-3220-250X

ВКЛАД АВТОРОВ:

С. В. Гончаров — идея статьи, сбор материала, постановка экспериментов *in vivo*, разработка метода оценки тяжести УФ-ожога, измерение и анализ морфометрических параметров, пробоподготовка и анализ биохимических данных, написание статьи, подготовка документов, переписка с редакцией.

S. V. Goncharov — idea of the article, collection of material, setting up *in vivo* experiments, development of a method for assessing the severity of UV burns, measurement and analysis of morphometric parameters, sample preparation and analysis of biochemical data, writing the article, preparing documents, correspondence with the editors.

О. М. Храмченкова — изготовление экстрактов лишайников, постановка эксперимента *in vitro*, измерение и анализ фотозащитных свойств композиций экстрактов из лишайников, консультирование, научное редактирование статьи.

О. М. Khranchenkova — preparation of lichen extracts, setting up an *in vitro* experiment, measuring and analyzing the photoprotective properties of lichen extract compositions, consulting, scientific editing of the article.

А. Е. Козлов — измерение биохимических параметров *in vivo*.

A. E. Kozlov — measurement of biochemical parameters *in vivo*.