

## ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ЭНАНТИОМЕРОВ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ IN VITRO В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© И. А. Прокопьев,<sup>1</sup> Э. В. Филиппов, Г. В. Филиппова, Н. П. Гладкина

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, 677980;

<sup>1</sup> электронный адрес: [iya.a.prokopiev@gmail.com](mailto:iya.a.prokopiev@gmail.com)

Проведено исследование цито- и генотоксического действия (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты в лимфоцитах периферической крови человека. Показано, что изученные энантиомеры усниновой кислоты в концентрации 0.04—0.30 мМ обладали выраженным цитотоксическим действием. Установлено, что энантиомеры усниновой кислоты в концентрации 0.04—0.30 мМ проявляли генотоксическое действие, при этом генотоксичность (-)-энантиомера усниновой кислоты в концентрациях 0.15 и 0.30 мМ была в 2 раза выше, чем у (+)-энантиомера. При действии (+)- и (-)-стереоизомеров усниновой кислоты наблюдали формирование атипичных «ДНК-комет», при этом (-)-усниновая кислота индуцировала в 2.5—3.5 раза больше атипичных «комет», чем ее (+)-стереоизомер.

Ключевые слова: лимфоциты, усниновая кислота, энантиомеры, цитотоксичность, генотоксичность, метод ДНК-комет.

Использованные сокращения: АФК — активные формы кислорода, ДМСО — диметилсульфоксид, ММС — метилметансульфонат.

Лишайниковые вещества представляют собой группу природных соединений, объединяемых термином «лишайниковые кислоты», которые не встречаются у других групп организмов. Всего известно порядка 800 соединений лишайниковых веществ, из которых наиболее часто встречаемой в талломах лишайников и хорошо изученной является усниновая кислота (Равинская, 1984; Шапиро, 1991; Дембицкий, Толстиков, 2005).

Известно, что в лишайниках содержатся (+) и (-) оптически активные формы усниновой кислоты, различающиеся *R* и *S* конфигурацией хирального атома  $C^{9b}$  (рис. 1). Установлено, что (+)-стереоизомер обладает большей антибактериальной активностью в отношении аэробных и анаэробных бактерий по сравнению с (-)-стереоизомером (Lauterwein et al., 1995). Вместе с тем оба стереоизомера усниновой кислоты проявляют выраженное бактерицидное действие в отношении грамположительных микроорганизмов и микобактерий, включая штаммы, устойчивые к антибиотикам (Stoll et al., 1950; Lauterwein et al., 1995; Cocchi et al., 2002).

Помимо антибактериальной активности энантиомеры усниновой кислоты обладают антипролиферативными и цитотоксическими свойствами, что делает их перспективными противоопухолевыми соединениями (Stanojkovic, 2015). Так, например, известно, что усниновая кислота проявляет *in vitro* цитостатическую и проапоптотическую активность относительно клеток лейкемии человека (K562), карциномы эндометрия (HEC-50), клеток рака груди (MCF-7) и некоторых других клеточных линий (Ingolfsdottir, 2002; Vazin et al., 2008). Вместе с тем сведения о генотоксическом и мутагенном действии лишайниковых кислот, включая усниновую, особенно ее стереоизо-

меров, в отношении «нормальных» клеток организма человека до сих пор носят спорадический и противоречивый характер.

Цель работы — изучить генотоксическое действие энантиомеров усниновой кислоты *in vitro* на лимфоциты периферической крови человека методом ДНК-комет.

### Материал и методика

В качестве объектов для выделения (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты использовали произрастающие в Центральной Якутии лишайники *Cladonia arbuscula* и *C. stellaris* соответственно так как они содержат преимущественно данные оптические изомеры (Huovinen, Ahti, 1986). Для выделения усниновой кислоты брали по 50 г измельченных воздушно-сухих талломов каждого вида лишайника и экстрагировали легким петролевым эфиром (фракция 40—70 °С) с использованием аппарата Сокслета в течение 12 ч. После остывания из частично упаренных экстрактов лишайников *C. stellaris* и *C. arbuscula* выпадал мелкокристаллический осадок желтого цвета (8—10 мг на 1 г талломов).

ИК-спектры выделенных веществ снимали на инфракрасном спектрометре с преобразователем Фурье Varian 7000 FT-IR (США) в таблетках бромида калия в диапазоне 400—4000  $cm^{-1}$ . УФ-спектры метанольных растворов выделенных соединений снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Япония) в диапазоне 190—350 нм.

Максимумы поглощения в УФ-спектре (MeOH): 232 и 282 нм. ИК-спектр (KBr): 1690, 1628, 1538, 1451, 1421,

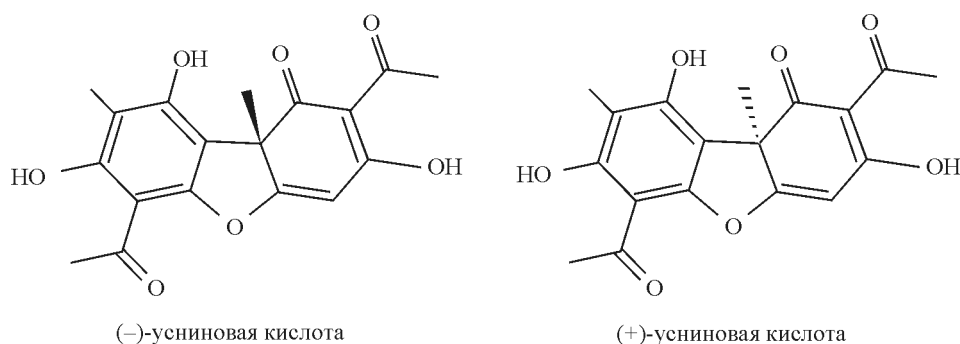


Рис. 1. Структурные формулы энантиомеров усниновой кислоты.

1375, 1356, 1334, 1317, 1287, 1221, 1189, 1144, 1118, 1070, 1040, 1024, 992, 958, 840, 819, 802 и 701  $\text{cm}^{-1}$ .

Сопоставление полученных спектров выделенных веществ с уже известными спектрами лишайниковых метаболитов показало, что выделенные соединения являются усниновой кислотой (Huneeck, 1996). Измерения угла вращения плоскости поляризации оптически активных форм выделенной усниновой кислоты проводили на автоматическом поляриметре А1-ЕПЛ (СССР). Подтверждено, что усниновая кислота, выделенная из лишайников *C. arbuscula* и *C. stellaris*, являлась (+)- и (-)-стереоизомерами соответственно  $[\alpha]_D^{21} +420$  и  $-500$  ( $\text{CHCl}_3$ , с 0.2).

Исследования цито- и генотоксичности проводили в соответствии с методическими рекомендациями (Дурнев и др., 2006). Для выделения лимфоцитов отбирали по 2.5 мл периферической крови у двух здоровых некурящих мужчин-доноров в возрасте от 20 до 30 лет. Отобранную кровь переносили в стерильные пробирки, содержащие 0.2 мл раствора гепарина. Далее цельную кровь смешивали с равным объемом среды RPMI-1640, осторожно наслаивали на 3 мл градиентной среды фикола и центрифугировали при 400  $g$  в течение 40 мин. Образующееся на разделе фаз «кольцо» из мононуклеаров отбирали пипеткой и дважды отмывали средой RPMI-1640 путем центрифугирования при 400  $g$  в течение 10 мин. После второй отмывки осадок разводили в среде RPMI-1640 до концентрации клеток  $2.5 \cdot 10^5/\text{мл}$ .

Генотоксичное действие энантиомеров усниновой кислоты оценивали по степени поврежденности ДНК лимфоцитов методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток, известным в литературе как метод «ДНК-комет» (Тронов, Полевина, 1996). Для этого в микроцентрифужные пробирки со средой RPMI-1640, содержащей лимфоциты в концентрации клеток  $0.5 \cdot 10^5/\text{мл}$ , вносили свежеприготовленные диметилсульфоксидные (ДМСО) растворы (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты до получения конечных концентраций 0.30, 0.15, 0.08, 0.04 и 0.02 мМ. Конечная концентрация ДМСО во всех исследуемых инкубационных смесях не превышала 1 об. %. В качестве отрицательного контроля использовали 1 % ДМСО, положительного — метилметансульфонат (ММС) в конечной концентрации 0.18 мМ. Полученные смеси инкубировали в течение 3 ч при 37 °С параллельно с контролями.

После инкубации лейкоциты дважды отмывали от компонентов среды натрий-фосфатным буфером (ФСБ), pH 7.5, путем центрифугирования при 1000  $g$  в течение 5 мин. После второй отмывки клетки ресуспендировали 0.1 мл ФСБ. Затем суспензию клеток (60 мкл) вносили в пробирку с 240 мкл 1%-ного раствора легкоплавкой ага-

розы и наносили на предварительно покрытые тугоплавкой агарозой предметные стекла. После затвердевания агарозы микропрепараты лизировали охлажденным буфером (10 мМ Трис-НСl, pH 10, 2.5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 1 % Тритона X-100 и 10 % ДМСО) не менее 1 ч при 4 °С. После окончания лизиса микропрепараты помещали в щелочной буфер для электрофореза (300 мМ NaOH и 1 мМ ЭДТА, pH > 13) на 20 мин для денатурации ДНК и реализации щелочеллабильных сайтов в одонитевые разрывы. Электрофорез проводили в течение 20 мин при напряженности поля 1 В/см и силе тока ~300 мА, после чего препараты фиксировали в 70%-ном растворе этанола и высушивали. Непосредственно перед микрофотографированием препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (20 мкг/мл) в течение 30 мин. Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе ЛабМед-2Л (Россия), используя возбуждающий и отсекающий светофильтры на 490 и 530 нм соответственно. Полученные с микропрепаратов изображения «ДНК-комет» анализировали с использованием программного обеспечения CASP 2.2.1. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте «комет» (% ДНК в хвосте от общего количества ДНК в «комете»). В микропрепаратах «ДНК-комет» выявленные атипичные «ДНК-кометы» с отсутствующей или практически отсутствующей головкой и широким диффузным хвостом выделяли в отдельную категорию и исключали из общего анализа, поскольку ДНК в хвосте таких комет представлена в виде коротких дискретных фрагментов, свидетельствующих о нуклеазной деградации ДНК.

Жизнеспособность лимфоцитов определяли методом комбинированной окраски этидиумом бромидом и 5,6-карбоксифлуоресцеин диацетатом (CFDA). Для этого к 0.1 мл клеточных суспензий, полученных после инкубации с описанными выше концентрациями энантиомеров усниновой кислоты, добавляли 25 мкл раствора красителей (0.025%-ный этидиум бромид и 0.042%-ный CFDA) и инкубировали в течение 5 мин. После отмывки от красителя клеточные суспензии наносили на предметные стекла и анализировали на флуоресцентном микроскопе. На каждые 100 клеток подсчитывали количество живых (зеленая окраска) и погибших (красная окраска) клеток.

Все измерения выполнены в четырех повторностях. Полученные результаты представлены в виде средней арифметической величины и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Сравнение средних значений выборок проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), значимость отличий от контроля определяли с помощью критерия Даннета для множественных сравнений, при уровне  $p \leq 0.05$ . Расчет проводили с помощью

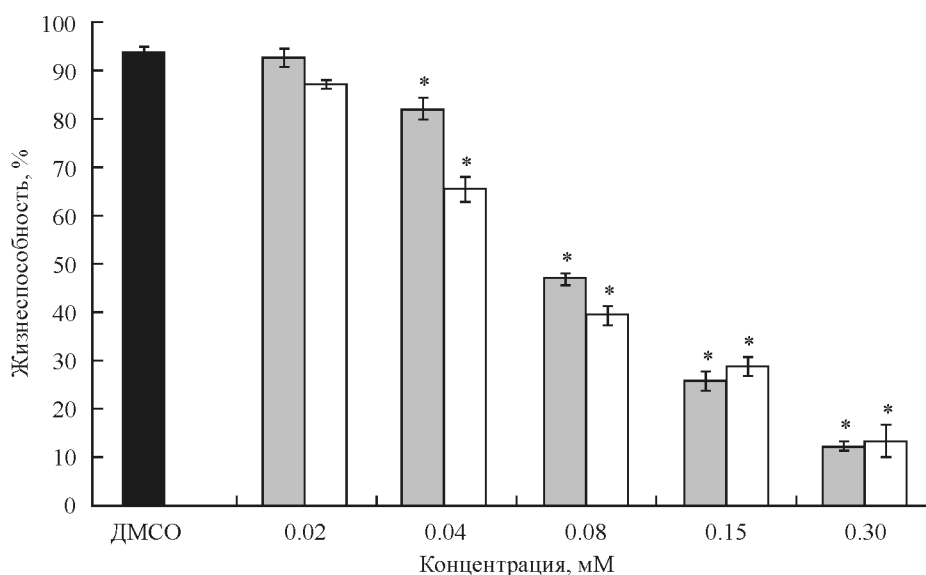


Рис. 2. Жизнеспособность лимфоцитов при действии различных концентраций (-) и (+)-энантиомеров усниновой кислоты. Серые столбцы — (-)-энантиомер, белые столбцы — (+)-энантиомер; звездочками отмечены статистически значимые отличия от отрицательного контроля (1 % DMSO, черный столбец) при  $p \leq 0.05$  (ANOVA, *t*-тест Даннета).

пакета AnalystSoft, StatPlus — программа статистического анализа, v.2007.

Использованные реактивы: ДМСО, ММС, RPMI-1640, CFDA, этидиум бромид и SYBR Green I (Sigma, США).

## Результаты и обсуждение

В работе Купчана и Коппермана (Kurchan, Kopperman, 1975) впервые приведены сведения о цитостатическом действии (-)-усниновой кислоты в отношении легочной карциномы Льюиса. В настоящее время исследование в этой области продолжают. Так, в ряде работ (Mayer et al., 2005; Koparal et al., 2006) с использованием метода МТТ показано значимое цитотоксическое действие различных концентраций усниновой кислоты на раковые клетки (MCF-7, MDA-MB-231 и A549) и фибробласты (V79). Кроме того, было показано, что даже сравнительно небольшие концентрации усниновой кислоты (5.0—10.0 мкМ) способны инициировать некротические процессы в культуре клеток гепатоцитов мышей (Han et al., 2004). Вместе с тем не все авторы единодушны в оценке цитотоксического действия усниновой кислоты. Так, исследование влияния (+)-усниновой кислоты в концентрациях от 0.05 до 0.60 мМ на фибробласты (V79) методом окрашивания трипановым синим не выявило значимого снижения их жизнеспособности вплоть до концентрации 0.40 мМ (Leandro et al., 2013).

Проведенное нами исследование жизнеспособности клеток лимфоцитов периферической крови показало значимое цитотоксическое действие различных концентраций (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты (рис. 2). На рис. 2 видно, что число живых клеток при действии энантиомеров усниновой кислоты в концентрациях от 0.04 до 0.30 мМ было в 1.1—7 раз ниже, чем в отрицательном контроле. Показано, что (-)-усниновая кислота в концентрациях 0.04 и 0.08 мМ проявляла менее выраженное цитотоксическое действие на клетки лимфоцитов, чем ее (+)-стереоизомер. Ранее в работе Копарала с соав-

торами (Koparal et al., 2006) на клетках линий V79 и A549 было показано, что (+)-усниновая кислота обладала более выраженным цитотоксическим действием, чем (-)-энантиомер, что согласуется с полученными нами данными.

По имеющимся представлениям, основным источником энергии в покоящихся лимфоцитах являются митохондрии (Kramer et al., 2014). Одним из механизмов цитотоксического действия лишайниковых кислот, включая усниновую, может быть потеря митохондриального мембранного потенциала вследствие разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования, приводящая к снижению синтеза АТФ, повышению пула активных форм кислорода (АФК) и к последующей гибели клеток (Abo-Khatwa et al., 1996; Han et al., 2004; Pramyothin et al., 2004; Einarsdóttir et al., 2010; Vačková et al., 2012). Вместе с тем в одной из работ (Brisdelli et al., 2013) было показано, что при обработке клеток HeLa лишайниковыми кислотами, в том числе усниновой, в различных концентрациях проявление цитотоксического действия не сопровождалось избыточным образованием АФК. Таким образом, продолжение исследований клеточных механизмов цитотоксического действия лишайниковых кислот остается актуальным.

Первые исследования генотоксичности усниновой кислоты методом микробиологического теста Эймса не выявили ее мутагенного действия (Shibamoto, Wei, 1984). Позднее было показано увеличение частоты образования микроядер в полихроматических нормобластах мышей при пероральном вводе (+)-усниновой кислоты в расчете дозы 100—200 мг на 1 кг массы животного (Al-Bekairi et al., 1991). В то же время в работах по исследованию генотоксического влияния различных концентраций (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты на лимфоциты периферической крови человека и фибробласты (V79) не обнаружено значимого повышения частоты образования хромосомных aberrаций и микроядер в клетках (Koparal et al., 2006; Leandro et al., 2013; Polat et al., 2013). Вместе с тем исследование генотоксического действия (+)-усниновой кислоты на клетки V79 более чувствительным методом щелочного гель-электрофореза изолированных кле-

**Генотоксическое действие различных концентраций энантиомеров усниновой кислоты в отношении лимфоцитов периферической крови человека**

Концентрация, мМ	Доля ДНК в хвосте, %	Частота атипичных «ДНК комет», %
Отрицательный контроль (1 % DMSO)	0.9 ± 0.1	2.6 ± 0.6
Положительный контроль (MMS, 0.18)	38.3 ± 3.0 <sup>a</sup>	17.0 ± 2.0 <sup>a</sup>
(+)-усниновая кислота		
0.02	0.5 ± 0.1	1.7 ± 0.3
0.04	2.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.7
0.08	5.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
0.15	8.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	16.5 ± 1.4 <sup>a</sup>
0.30	13.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	21.5 ± 1.5 <sup>a</sup>
(-)-усниновая кислота		
0.02	0.5 ± 0.1	4.0 ± 1.5
0.04	2.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.8 <sup>a</sup>
0.08	6.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.4 <sup>a</sup>
0.15	15.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	36.6 ± 2.1 <sup>a</sup>
0.30	35.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	73.3 ± 4.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> — Различия статистически значимы по сравнению с отрицательным контролем при  $p < 0.05$  (ANOVA,  $t$ -тест Даннета).

ток выявило значимое увеличение степени повреждения геномной ДНК при концентрации 0.18—0.36 мМ по сравнению с контролем (Leandro et al., 2013).

Нами проведено исследование генотоксичности различных концентраций двух энантиомеров усниновой кислоты *in vitro* в лимфоцитах периферической крови человека методом «ДНК-комет» в щелочной среде. Показано, что степень повреждения ДНК (% ДНК в хвосте «кометы») после инкубации лимфоцитов при концентрации 0.04—0.30 мМ (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты была в 3—14 и 2—35 раз соответственно выше по сравнению с отрицательным контролем (см. таблицу). При этом генотоксическое действие (-)-усниновой кислоты в концентрациях 0.15 и 0.30 мМ было в среднем в 2 раза выше, чем (+)-стереоизомера при тех же концентрациях. По-видимому, более высокая генотоксичность (-)-усниновой кислоты (реализуемая в односторонних разрывах ДНК) могла быть причиной формирования большего числа апоптотических клеток в популяции лимфоцитов человека, что наблюдали ранее другие авторы (Korparal et al., 2006).

После инкубации лимфоцитов с различными концентрациями энантиомеров усниновой кислоты были выявлены «кометы» с отсутствующей или практически отсутствующей головой и широким диффузным хвостом, так называемые ghost cells или hedgehogs. По имеющимся представлениям, появление таких атипичных «ДНК-комет» является следствием процесса клеточной гибели, связанного с высоким уровнем оксидативного стресса либо с формированием клеток, находящихся на стадии фрагментации хроматина (Olive et al., 1995; Yasuhara et al., 2003; Жанатаев и др., 2011).

Показано, что доля лимфоцитов с атипичными «ДНК-кометами» в клеточных суспензиях, инкубируемых с (+)-усниновой кислотой в концентрации 0.08—0.30 мМ и

(-)-энантиомера в концентрации 0.04—0.30 мМ, была выше в 2—8 и 3—28 раз соответственно по сравнению с отрицательным контролем. Выявлено, что (-)-усниновая кислота в диапазоне концентраций 0.04—0.30 мМ индуцировала больше атипичных «комет» (в 2.5—3.5 раза), чем ее (+)-стереоизомер.

Появление атипичных «ДНК-комет», как было отмечено выше, связывают с процессом клеточной гибели. Между тем в работе Лоренцо с соавторами (Lorenzo et al., 2013) было изучено генотоксическое действие пероксида водорода на культуру клеток HeLa в зависимости от продолжительности инкубации и показано, что первичное сильное повреждение ДНК, выраженное в виде атипичных «комет», снижается в течение определенного времени вследствие активации систем репарации. Т. е. генотоксические эффекты, проявляющиеся в виде атипичных «ДНК-комет», не всегда являются следствием цитотоксического действия исследуемого соединения. Нами выявлено, что при действии (+)-усниновой кислоты в концентрации 0.30 мМ частота атипичных «комет» составляла 21.5 ± 1.5 % (см. таблицу), при этом фактический цитотоксический эффект достигал 85—90 % (рис. 2). Вместе с тем в положительном контроле (ММС) наблюдали противоположный эффект — при жизнеспособности на уровне отрицательного контроля частота атипичных «комет» составляла 17 ± 2 %. Полученные данные подтверждают мнение о необязательной взаимосвязи между частотой атипичных «комет» и жизнеспособностью клеток, в этой связи исследования генотоксичности всегда необходимо сопровождать надежной оценкой цитотоксичности.

Таким образом, изученные энантиомеры усниновой кислоты в концентрации 0.04—0.30 мМ обладали выраженной цитотоксичностью в отношении лимфоцитов периферической крови человека. Установлено, что (+)- и (-)-энантиомеры усниновой кислоты в концентрации 0.04—0.30 мМ проявляли генотоксическое действие, при этом генотоксичность (-)-усниновой кислоты в концентрациях 0.15 и 0.30 мМ была в 2.0 раза выше, чем у (+)-энантиомера. При действии изученных энантиомеров усниновой кислоты наблюдали формирование атипичных «ДНК-комет», при этом (-)-усниновая кислота индуцировала в 2.5—3.5 раза больше атипичных «комет», чем ее (+)-энантиомер. Предполагается, что различное генотоксическое действие (+)- и (-)-энантиомеров усниновой кислоты является проявлением их хирально-специфичной активности, детальное изучение механизма которой требует проведения дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику Научно-исследовательского института фармакологии им. В. В. Закусова к. б. н. А. К. Жанатаеву за оказанную помощь в обсуждении результатов исследования.

Работа выполнена в рамках государственных заданий по проектам № 0376-2014-0007 и 0376-2014-0005 при финансовой поддержке гранта главы РС (Я) для молодых ученых специалистов и студентов на 2016 г.

#### Список литературы

Дембицкий В. М., Толстиков Г. А. 2005. Органические метаболиты лишайников. Новосибирск: Изд-во СО РАН, филиал «Гео». 135 с. (Dembitskij V. M., Tolstikov G. A. 2005. Organic metabolites of lichens. Novosibirsk: Izd-vo SO RAN, «Geo». 135 p.)

- Дурнев А. Д., Жанатаев А. К., Анисина Е. А., Сиднева Е. С., Никитина В. А., Оганесянц Л. А., Середенин С. Б. 2006. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. М.: Полиграфсервис. 27 с. (Durnev A. D., Zhanataev A. K., Anisina E. A., Sidneva E. S., Nikitina V. A., Oganesyants L. A., Seredenin S. B. 2006. Application of the alkaline gel electrophoresis to assess isolated cells genotoxic properties of natural and synthetic compounds. Guidelines. Moscow: Poligrafservis. 27 p.)
- Жанатаев А. К., Никитина В. А., Воронина Е. С., Дурнев А. Д. 2011. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет. Прикладная токсикология. 2 (4) : 28—37. (Zhanataev A. K., Nikitina V. A., Voronina E. S., Durnev A. D. 2011. Methodical aspects of DNA-damage assessment comet assay method. Prikladnaya Toksikologiya. 2 (4) : 28—37.)
- Равинская А. П. 1984. Лишайниковые кислоты и их биологическая роль. Новости систематики низших растений. 21 : 160—179. (Ravinskaya A. P. 1984. Lichen substances and their biological role. Novosti sistematiki nizshih rasteniy. 21 : 160—179.)
- Тронов В. А., Полевина Т. А. 1996. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применение метода. Цитология. 38 (4/5) : 427—439. (Tronov V. A., Polevina T. A. 1996. DNA comet of individual cell assay. Principle and application of the method. Tsitologiya. 38 (4/5) : 427—439.)
- Шануро И. А. 1991. Загадки растения сфинкса. Лишайники и экологический мониторинг. Л.: Гидрометеоздат. 82 с. (Shapiro I. A. 1991. Riddles of the Sphinx plants. Lichens and environmental monitoring. Leningrad: Gidrometeoizdat. 82 p.)
- Abo-Khatwa A. N., Al-Robai A. A., Al-Jawhari D. A. 1996. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. Natural Toxins. 4 : 96—102.
- Al-Bekairi A. M., Qureshi S., Chaudhry M. A., Krishnaa D. R., Shahb A. H. 1991. Mitodepressive, clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice. J. Ethnopharmacol. 33 : 217—220.
- Báčkorova M., Jendželovský R., Kello M., Báčkor M., Mikeš J., Fedoročko P. 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. Toxicol. In Vitro. 26 : 462—468.
- Bazin M.-A., Le Lamer A.-C., Delcros J.-G., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., Corbel J.-C., Tomasi S. 2008. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. Bioorg. Med. Chem. 16 : 6860—6866.
- Brisdelli F., Perilli M., Sellitri D., Piovano M., Garbarino J. A., Nicoletti M., Bozzi A., Amicosante G., Celenza G. 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. Phytother. Res. 27 : 431—437.
- Cocchietto M., Skert N., Nimis P. L., Sava G. 2002. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften. 89 : 137—146.
- Einarsdóttir E., Groeneweg J., Bjornsdóttir G. G., Hardardóttir G., Omarsdóttir S., Ingólfssdóttir K., Ögmundsdóttir H. M. 2010. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. Planta Med. 76 : 969—974.
- Han D., Matsumaru K., Rettori D., Kaplowitz N. 2004. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 67 : 439—451.
- Huneck S., Yoshimura I. 1996. Identification of lichen substances. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 493 p.
- Huovinen K., Ahti T. 1986. The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladina*. Ann. Bot. Fennici. 23 : 93—106.
- Ingólfssdóttir K. 2002. Usnic acid. Phytochemistry. 61 : 729—736.
- Koparal A. T., Tuylu B. A., Turk H. 2006. *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. Nat. Prod. Res. 20 : 1300—1307.
- Kramer P. A., Ravi S., Chacko B., Johnson M. S., Darley-Usmar V. M. 2014. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. Redox Biol. 2 : 206—210.
- Kupchan S. M., Kopperman H. L. 1975. l-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from Lichens. Experientia. 31 : 625.
- Lauterwein M., Oethinger M., Belsner K., Peters T., Marre R. 1995. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (–)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. Antimicrob. Agents Chem. 39 : 2541—2543.
- Leandro L. F., Munari C. C., Ferreira L. S. et al. 2013. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. 753 : 101—106.
- Lorenzo Y., Costa S., Collins A. R., Azqueta A. 2013. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. Mutagenesis. 28 : 427—432.
- Mayer M., O'Neill M. A., Murray K. E., Santos-Magalhaes N. S., Carneiro-Leao A. A., Thompson A. M., Appleyard V. C. L. 2005. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anticancer properties. Anticancer Drug. 16 : 805—809.
- Olive P. L., Banath J. P. 1995. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA cross-linking agent. Exp. Cell Res. 221 : 19—26.
- Polat Z., Aydin E., Türkez H., Aslan A. 2013. *In vitro* risk assessment of usnic acid compound. Toxicol. Ind. Health November. 5 : 1—8.
- Pramyothin P., Janthasoot W., Pongnimitprasert N., Phrukdom S., Ruangrungrasi N. 2004. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. J. Ethnopharmacol. 90 : 381—387.
- Shibamoto T., Wei C. I. 1984. Mutagenicity of lichen constituents. Environ. Mutagen. 6 : 757—762.
- Stanokovic T. 2015. Investigations of Lichen secondary metabolites with potential anticancer activity. In: Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential. New York; London: Springer. 81—104.
- Stoll A., Brack A., Renz J. 1950. Die Wirkung von Flechtensstoffen auf Tuberkelbakterien und auf einige andere Mikroorganismen. Schweiz. Z. Allg. Pathol. Bakteriologie. 13 : 729—751.
- Yasuhara S., Zhu Y., Matsui T., Tipirneni N., Yasuhara Y., Kaneki M., Rosenzweig A., Martyn J. A. 2003. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. J. Histochem. Cytochem. 51 : 873—885.

GENOTOXIC EFFECT OF USNIC ACID ENANTIOMERS *IN VITRO*  
IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES*I. A. Prokopiev,<sup>1</sup> E. V. Filippov, G. V. Filippova, N. P. Gladkina*

Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk, 677980;

<sup>1</sup> e-mail: ilya.a.prokopiev@gmail.com

Cytotoxic and genotoxic effect of (+) and (–) enantiomers of usnic acid in human peripheral blood lymphocytes studied. We have shown that the studied usnic acid enantiomers in concentrations of 0.04–0.30 mM have a pronounced cytotoxic effect. We have found that the enantiomers of usnic acid in concentrations 0.04–0.30 mM exhibit genotoxic effect. Genotoxicity of (–)-usnic acid enantiomer in concentrations of 0.15 and 0.30 mM was in 2 times higher than that of the (+) enantiomer. It has been noted that (+) and (–) usnic acid enantiomers induce atypical «comets» (hedgehogs). Wherein, (–)-usnic acid induced to 2.5–3.5 times more atypical «comets» than its (+) enantiomer.

**Key words:** lymphocytes, usnic acid, enantiomers, cytotoxicity, genotoxicity, comet assay.

---