

## ФАРМАКОЛОГИЯ И ФАРМАЦИЯ PHARMACOLOGY AND PHARMACY

### ПОЛУЧЕНИЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ ФОРМ ФУРАНОКУМАРИНОВ БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО И ОЦЕНКА ИХ ФОТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ *IN VITRO*

#### РЕЗЮМЕ

Шляпкина В.И.,  
Куликов О.А.,  
Бродовская Е.П.,  
Аль-хадж Аюб А.М.,  
Агеев В.П.,  
Пятаев Н.А.

ФГБОУ ВО «Национальный  
исследовательский Мордовский  
государственный университет  
им. Н.П. Огарева» (430005, г. Саранск,  
ул. Большевикская, 68, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
Шляпкина Василиса Игоревна,  
e-mail: shlyapkina.98@mail.ru

**Обоснование.** Для фотохимиотерапии различных заболеваний используются средства на основе фуранокумаринов. Доступным источником фуранокумаринов для создания лекарственных препаратов может быть борщевик Сосновского.

**Цель исследования.** Получить стабильные эмульсии, содержащие фуранокумарины, из борщевика Сосновского и оценить их фотоцитотоксичность.

**Материалы и методы.** Фуранокумарины для получения эмульсий экстрагировали хлороформом из сока надземной части борщевика Сосновского. Хлороформный экстракт очищали с помощью градиентной колоночной хроматографии на силикагеле. Экстрактивную фракцию, содержащую фуранокумарины, анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым (УФ) детектированием.

Экстракт с высоким содержанием 8-метоксипсоралена использовали для получения двух видов эмульсий. Экстракт растворяли в персиковом масле и эмульгировали в воде твином-80 (эмульсия № 1) и в водно-глицериновом растворе лецитином (эмульсия № 2).

Эмульсии тестировали на темновую и фотоиндуцированную токсичность для фибробластов лёгких человека. Доза УФ-излучения для фотоактивации фуранокумаринов составила 9 Дж/см<sup>2</sup>. В качестве фотосенсибилизатора сравнения использовали раствор хлорина еб.

**Результаты.** Полученные эмульсии содержали 1 мг/мл 8-метоксипсоралена. Обе эмульсии были гомогенными при макро- и микроскопической визуализации, сохраняли стабильность при хранении в различных температурных условиях в течение 14 дней. Эмульсия № 2 не проявляла темновой токсичности и вызывала статистически значимое угнетение жизнеспособности клеток при УФ-облучении и концентрации 12,5–31,3 мкг/мл. Эмульсия № 1 оказывала токсическое действие на клетки независимо от УФ-облучения из-за содержания в составе твина-80. По данным флуоресцентной микроскопии, фототоксическое действие эмульсии № 2 проявлялось главным образом за счёт апоптоза, в отличие от действия хлорина еб, при котором имелись более выраженные признаки некроза клеток.

**Заключение.** Разработанные экспериментальные эмульсионные формы фуранокумаринов борщевика Сосновского являются пример перспективных лекарственных фотосенсибилизаторов растительного происхождения для фототерапии различных заболеваний в сфере дерматологии и онкологии.

**Ключевые слова:** эмульсия, фуранокумарины, борщевик Сосновского, УФ-излучение, твин-80, лецитин, апоптоз

**Для цитирования:** Шляпкина В.И., Куликов О.А., Бродовская Е.П., Аль-хадж Аюб А.М., Агеев В.П., Пятаев Н.А. Получение эмульсионных форм фуранокумаринов борщевика Сосновского и оценка их фототоксического действия *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(3): 161-171. doi: 10.29413/ABS.2023-8.3.18

Статья поступила: 21.12.2022

Статья принята: 31.05.2023

Статья опубликована: 11.07.2023

## OBTAINING EMULSIONS OF FURANOCOUMARINS FROM SOSNOWSKY'S HOGWEED AND *IN VITRO* ASSESSMENT OF THEIR PHOTOTOXIC EFFECT

Shlyapkina V.I.,  
Kulikov O.A.,  
Brodovskaya E.P.,  
Al-khadj Aioub A.M.,  
Ageev V.P.,  
Pyataev N.A.

National Research Ogarev  
Mordovia State University  
(Bolshevistskaya str. 68, Saransk 430005,  
Russian Federation)

Corresponding author:  
Vasilisa I. Shlyapkina,  
e-mail: shlyapkina.98@mail.ru

### ABSTRACT

**Background.** Furanocoumarin-based drugs are used for photochemotherapy of various diseases. Sosnowsky's hogweed can be an available source of furanocoumarins for the development of drugs.

**The aim of the study.** To obtain stable emulsions containing furanocoumarins from Sosnowsky's hogweed and to evaluate their photocytotoxicity.

**Materials and methods.** To obtain the emulsions, furanocoumarins were extracted with chloroform from the sap of the aerial part of the Sosnowsky's hogweed. The chloroform extract was clarified by silica gel gradient column chromatography. The extractive fraction containing furanocoumarins was analyzed by high performance liquid chromatography with ultraviolet (UV) detection.

An extract with a high content of 8-methoxypsoralen was used to prepare two types of emulsions. The extract was dissolved in peach oil and emulsified in water with tween-80 (emulsion No. 1) and in an aqueous glycerin solution with lecithin (emulsion No. 2).

The emulsions were tested for dark and photo-induced toxicity for human lung fibroblasts. The dose of UV radiation for the photoactivation of furanocoumarins was 9 J/cm<sup>2</sup>. A solution of chlorine e6 was used as a comparison photosensitizer.

**Results.** The obtained emulsions contained 1 mg/ml 8-methoxypsoralen. Both emulsions were homogeneous at macro- and microscopic visualization, remained stable when stored under various temperature conditions for 14 days. Emulsion No. 2 did not show dark toxicity and caused a statistically significant inhibition of cell viability under UV irradiation at a concentration of 12.5–31.3 µg/mL. Emulsion No. 1 had a toxic effect on cells regardless of UV irradiation due to the content of tween-80. According to fluorescent microscopy, the phototoxic effect of emulsion No. 2 was manifested mainly due to apoptosis, in contrast to the effect of chlorine e6, in which there were more pronounced signs of cell necrosis.

**Conclusion.** The developed experimental emulsions of furanocoumarins from Sosnowsky's hogweed are an example of promising medicinal photosensitizers of plant origin for phototherapy of various dermatological and oncological diseases.

**Key words:** emulsion, furanocoumarins, Sosnowsky's hogweed, UV radiation, tween-80, lecithin, apoptosis

Received: 21.12.2022  
Accepted: 31.05.2023  
Published: 11.07.2023

**For citation:** Shlyapkina V.I., Kulikov O.A., Brodovskaya E.P., Al-khadj Aioub A.M., Ageev V.P., Pyataev N.A. Obtaining emulsions of furanocoumarins from Sosnowsky's hogweed and *in vitro* assessment of their phototoxic effect. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(3): 161-171. doi: 10.29413/ABS.2023-8.3.18

## ОБОСНОВАНИЕ

Одними из широко применяемых в медицине для фотохимиотерапии веществ являются фуранокумарины, среди которых клинически доказанный эффект имеется у производных псоралена (5-метоксипсорален (5-МОП), 8-метоксипсорален (8-МОП) и др.) [1]. Среди растений, содержащих высокие концентрации псоралена и его производных, выделяется борщевик Сосновского [2]. В ряде регионов земного шара, в том числе и в России, борщевик Сосновского, как и другие виды гигантских борщевиков, признан опасным фитоинвазивным видом и повсеместно истребляется [3]. Так как борщевик Сосновского широко распространён и быстро наращивает фитомассу, то его растительное сырьё весьма доступно для заготовки и фармацевтического использования.

В настоящее время источником фуранокумаринов для производства фотосенсибилизирующего препарата Аммифурин является растение амми большая (*Ammi majus*). Её плоды содержат около 2 % фуранокумаринов. Препараты из амми используются как антипсориатические средства для ПУВА-терапии (PUVA – psoralen and ultraviolet A) [4].

Амми большая уступает борщевiku Сосновского по фитомассе для получения фуранокумаринов. Фуранокумарины амми локализованы преимущественно в плодах растения и смешаны с большим количеством гидрофобных сопутствующих веществ [4]. Амми большую в диком виде можно встретить только в условиях тёплого климата [5, 6] и в других регионах она требует специальных условий культивирования.

Фуранокумарины – очень липофильные вещества, но для реализации фотобиологического потенциала они должны находиться в водной среде [7]. В различных исследованиях фуранокумарины тестируются в виде спиртовых растворов или растворов диметилсульфоксида (ДМСО) [8, 9], где фуранокумарины остаются стабильными в высоких концентрациях (более 1 мг/мл) при условии наличия не менее 80 % ДМСО в растворителе. Решить проблему растворимости фуранокумаринов в воде можно путём создания эмульсионной формы [10]. Получение эмульсионной формы фуранокумаринов может привести к изменению или исчезновению нативного фотосенсибилизирующего эффекта, вызываемого самим растением [11]. До настоящего времени не разрабатывались и не использовались эмульсии фуранокумаринов на основе лекарственного растительного сырья. В связи с этим становится актуальным контроль специфической активности действующих веществ, в нашем случае фуранокумаринов.

Эффективная лекарственная форма фуранокумаринов при доступном виде сырья для её изготовления может широко использоваться как средство для ПУВА-терапии или как противоопухолевое средство в борьбе с кожными неоплазиями – например, микроэмульсия для транскутанной доставки фуранокумаринов, содержащая различные эмульгаторы (изопропилмиристит, твин-80, спан-80, октандиол) [10]. Микроэмульсии

8-метоксипсоралена предназначены для ПУВА-терапии как локальные фотосенсибилизаторы. При этом вопрос о соотношении темновой и фотоиндуцированной токсичности в таких работах рассматривается несправедливо мало.

Существует мнение, что простая эмульсия для фотосенсибилизатора не пригодна без использования полимерных покрытий для эмульсионных капель, при этом не сравнивается фотосенсибилизирующее действие простых и полимер-ассоциированных эмульсий [11].

Для локального применения предложено использование наноэмульсий фуранокумаринов, где в качестве масляной фазы применяется эфирное масло. Показано, что, несмотря на мелкодисперсный состав (около 30 нм) полученной эмульсии, она также хорошо удерживается в коже [12]. Однако мы не можем, к примеру, говорить о парентеральном применении таких эмульсий.

У исследователей, предлагающих эмульсионные составы для кожного нанесения, достаточно большой выбор растворителей, так как фуранокумарины могут растворяться во многих эфирных и жирных маслах. Однако если фотосенсибилизатор необходимо ввести парентерально, то спектр возможных для применения масел резко сужается. Необходимость введения фотосенсибилизатора внутрисосудистым способом может быть продиктована более выраженным эффектом, в отличие от поверхностного нанесения, что неоднократно показано различными исследователями [13, 14]. Парентеральная лекарственная форма фотосенсибилизатора необходима и для внутриопухолевого введения при терапии нерезектабельных опухолей [15, 16] либо при доставке активирующего излучения через оптоволоконно в ткань опухоли [17].

**Целью данной работы** явилось получение стабильных эмульсий, содержащих фуранокумарины, выделенные из борщевика Сосновского, и оценка их фотоцитотоксичности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источником растительного сырья служила наземная часть *Heracleum sosnowskyi* Manden. Растение определяли, согласно руководству «The giant hogweed best practice manual. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe» (2005). Фракцию фуранокумаринов извлекали из сока наземной части. Процесс экстракции, очистки и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) осуществляли по описанной ранее методике [18], схема которой показана на рисунке 1.

Из экстрактивной фракции, содержащей фуранокумарины, были приготовлены две эмульсии с разными эмульгирующими агентами. Для изготовления эмульсий высушенный экстракт, содержащий 100 мг 8-МОП, растворяли при нагревании в 10 мл персикового масла (Мирролла, Россия). С нагретым масляным раствором экстракта проводилась дальнейшая работа по изготовлению эмульсий.

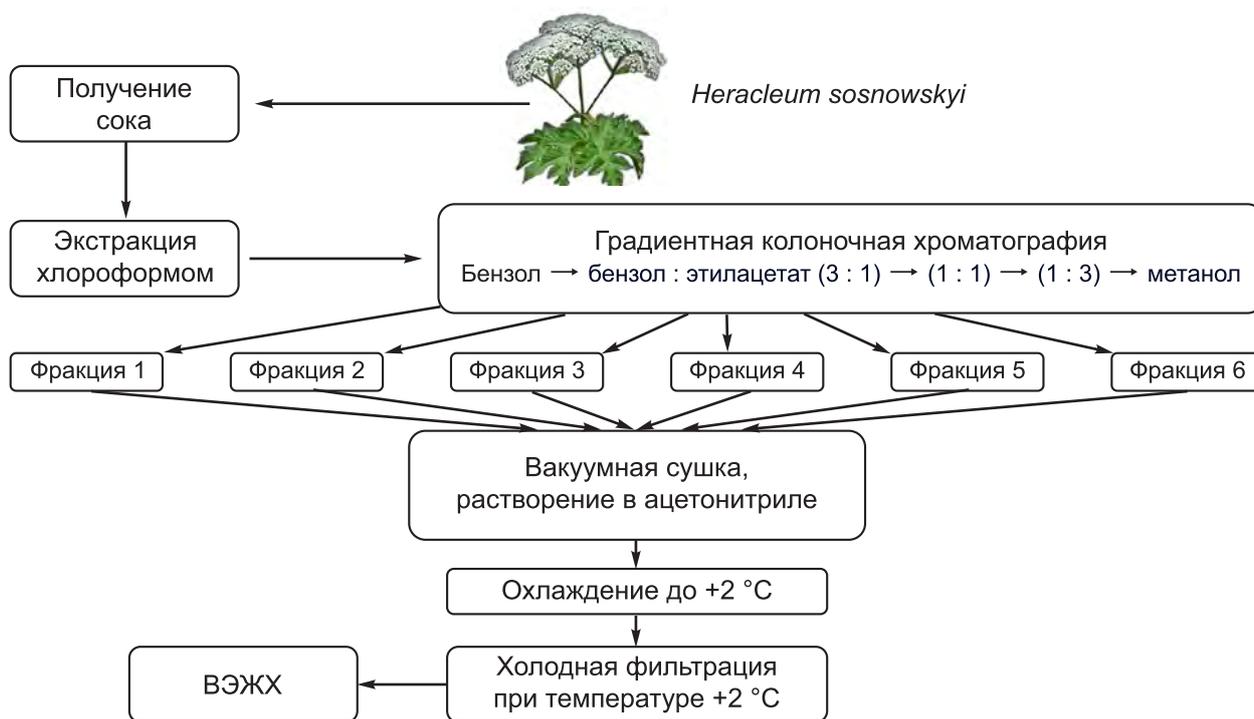
При первом способе изготовления эмульсии фуранокумаринов (эмульсия № 1) использован в качестве стабилизатора водный 2,5%-й раствор полисорбата 80 (Твин-80) (Sigma-Aldrich, США). При интенсивном перемешивании и постоянной температуре 25 °С к 5 мл раствора полисорбата по каплям добавляли 1 мл (0,916 г) масляного раствора фуранокумаринов борщевика Сосновского с концентрацией 8-МОП 6,125 мг/мл. Готовая смесь перемешивалась в течение 10 минут, затем подвергалась воздействию ультразвука (50 Вт) в течение 10 минут. Всего было проведено 3 повторяющихся цикла эмульгирования. Качество образовавшейся эмульсии контролировали с помощью световой микроскопии в три этапа: 1) сразу после приготовления; 2) после хранения в холодильнике в течение 96 ч при температуре 4 °С; 3) после хранения при температуре 20–22 °С в течение 14 дней.

Второй вариант эмульсии фуранокумаринов (эмульсия № 2). Изготовление водной фазы происходило путём добавления к 5 мл деионизованной воды 0,1315 г глицерина (Sigma-Aldrich, США); смесь перемешивалась на магнитной мешалке при температуре 70–75 °С. Параллельно изготавливалась масляная фаза из 0,1 г лецитина (фосфатидилхолин, EPCS 10 8018–1/130, Lipoid, Гер-

мания) и 0,916 г масляного раствора фуранокумаринов борщевика, полученного по вышеописанному методу. Смесь перемешивалась при температуре 90 °С до получения однородной массы. К водной фазе при интенсивном перемешивании и температуре 70–75 °С медленно прикапывалась масляная фаза. Полученная эмульсия перемешивалась при температуре 70–75 °С в течение 10 минут. Затем смесь была подвергнута гомогенизации с помощью ультразвука (200 Вт – 1 мин; цикл 2 с/2 с) до формирования эмульсионных глобул.

Исследование цитотоксичности эмульсий проводили на клеточной культуре фибробластов лёгких человека (HLF, human lung fibroblasts) ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В экспоненциальную фазу роста клетки рассеивались в 96-луночный планшет в концентрации 5 тыс. клеток/лунка и инкубировались в течение 24 ч в стандартных условиях на среде DMEM с добавлением 10 % FBS (fetal bovine serum) и антибиотиков (пенициллин-стрептомицин) при 5%-м CO<sub>2</sub> и температуре 37 °С.

Фототоксические реакции фуранокумаринов индуцировали с помощью ультрафиолетовой (УФ) лампы 365 нм



**РИС. 1.** Схема выделения фракции фуранокумаринов из сока борщевика Сосновского. ВЭЖХ экстрактивных фракций осуществлялась в изократическом режиме (хроматограф Gilson (Франция), колонка Kromasil C18 4,5 мм × 5 мкм × 250 мм). Подвижная фаза: вода/ацетонитрил (1:1). Скорость потока 0,8 мл/мин. Детектирование при длине волны 250 нм. Программное обеспечение «Милlichром» (Россия). Аналитические стандарты: 5-метоксипсорален, 8-метоксипсорален (Sigma-Aldrich, США)

**FIG. 1.** Scheme for isolating the furanocoumarin fraction from the Sosnovsky's hogweed sap. High-efficiency liquid chromatography of extractive fractions was carried out in isocratic mode (chromatography system by Gilson (France); Kromasil C18 column 4.5 mm × 5 μm × 250 mm). Mobile phase: water/acetonitrile (1:1). Flow rate 0.8 ml/min. Detection at wavelength 250 nm. Software "Millichrome" (Russia). Analytical standards: 5-methoxypsoralen, 8-methoxypsoralen (Sigma-Aldrich, USA)

мощностью 40 Вт (Camelion LH26-FS/BLB/E27, Китай), которую располагали на фиксированном расстоянии 20 см от клеток-мишеней, чтобы получить постоянную интенсивность излучения 35 мВт/см<sup>2</sup>. Интенсивность излучения измеряли с помощью радиометра ThorLabs PM100D (Германия). Фототоксическое воздействие эмульсий определяли при концентрациях 8-МОП в лунке планшета: 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2 и 1 мкг/мл. Через 4 часа [19] после внесения эмульсий клетки облучали УФ-излучением.

Для контроля фотодинамического стресса использовали фотосенсибилизатор из группы порфиринов хлорин еб. Раствор хлорина еб (50 мкг/мл) готовили в ДМСО (50 мг/мл) и хранили в темноте при 4 °С. Для индукции фотодинамического действия с помощью хлорина еб использовали концентрации в лунке планшета: 6,3–0,05 мкг/мл [20, 21]. При этом клетки облучали излучением светодиодной лампы с длиной волны 660 нм.

Дозу излучения подбирали эмпирически по результатам контрольного опыта без внесения тестируемых агентов. Через 1 ч после облучения клетки трипсинизировали и переносили в 96-луночный планшет со средой. Через 24 ч инкубации оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста [22]. Твин-80 и лецитин вносились отдельно для оценки их вклада в цитотоксическое действие. Контроль фототоксического действия каждого фотосенсибилизатора проводился относительно клеток, которые после внесения тестируемых субстанций помещались в темноту. Жизнеспособность клеток во всех экспериментальных группах оценивали относительно контрольной серии лунок (негативный контроль), в которые не помещался тест-компонент и не производилось облучение.

Через 24 ч инкубации среду заменяли на 5%-й раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил). МТТ восстанавливался до кристаллов формазана, что оце-

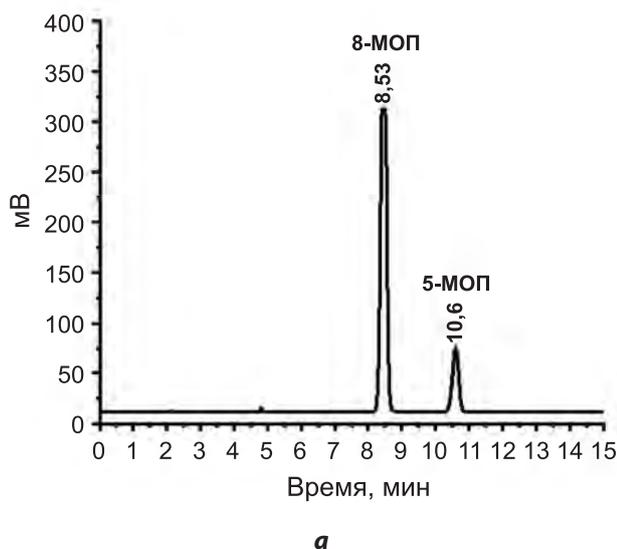
нивалось с помощью инвертированного микроскопа (Микромед, Россия). Затем среду удаляли и добавляли 150 мкл ДМСО и шейкировали в течение 20 минут при 37 °С. Оптическую плотность измеряли на приборе Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 570 нм против 650 нм референсной. Результаты оптической плотности (OD, optical density) отображали в % OD (образца) / OD (контроля).

Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (SEM, standard error of mean) для > 3 независимых экспериментов или значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration) и их 95%-х доверительных интервалов, полученных с помощью нелинейной регрессии. Различия между экспериментальными группами сравнивали с помощью статистической обработки данных, используя t-критерий Стьюдента и критерий ANOVA. Критический уровень статистической значимости различий составил 5 % ( $p < 0,05$ ). Все статистические анализы проводились с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 10.0 (IBM Corp., США).

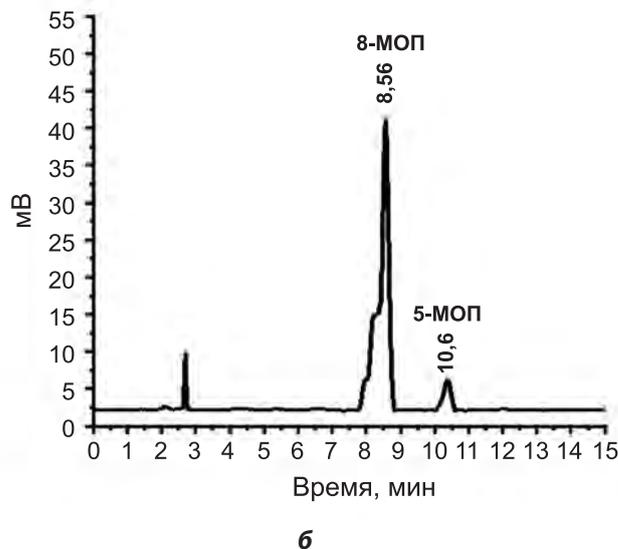
## РЕЗУЛЬТАТЫ

При помощи ВЭЖХ экстракта была найдена фракция с высоким содержанием фуранокумаринов (8- и 5-метоксипсоралена). Внешний вид хроматограмм показан на рисунке 2.

Время удержания веществ экстракта борщевика Сосновского соответствовало времени удержания аналитических стандартов 8- и 5-МОП. Согласно калибровочному графику (зависимости площади пика от концентрации), построенному с использованием раствора



**РИС. 2.**  
Хроматограммы раствора фуранокумаринов (8- и 5-метоксипсоралена) в ацетонитриле (а) и экстракта сока борщевика Сосновского, содержащего высокие концентрации этих же фуранокумаринов (б)



**FIG. 2.**  
Chromatograms of a solution of furanocoumarins (8- and 5-methoxypsoralen) in acetonitrile (a) and of the extract of Sosnovsky's hogweed sap containing high concentrations of the same furanocoumarins (b)

5- и 8-МОП в ацетонитриле, концентрация 8-МОП в исходном соке составила 506 мг/л, а 5-МОП – 23 мг/л.

Исходя из преобладания в соке борщевика Сосновского 8-МОП, данный фуранокумарин был взят в качестве дозируемого действующего вещества в составе эмульсий.

При концентрации 8-МОП в персиковом масле 6,125 мг/мл при комнатной температуре (20 °С) не образовывалось игольчатых кристаллов фуранокумаринов и получался стабильный масляный раствор, однако при помещении раствора в холодильник при температуре 4 °С происходило выпадение игольчатых кристаллов. Концентрация в масляном растворе 8-МОП, которая при температурах 20 °С и 4 °С не приводила к появлению кристаллов, составила 3 мг/мл. Полученный экспериментально предел растворимости экстрактивных фуранокумаринов в масле схож с таковым, полученным В. Varoli и соавт. для химических субстанций [10].

Количество ингредиентов эмульсий указано в таблице 1. Обе эмульсии содержали 8-МОП в концентрации 1 мг/мл.

Полученные эмульсии имели гомогенный вид визуально и при микроскопии. Образцы эмульсии сохраняли стабильность в течение срока хранения 14 дней и более в диапазоне температур 4–20 °С.

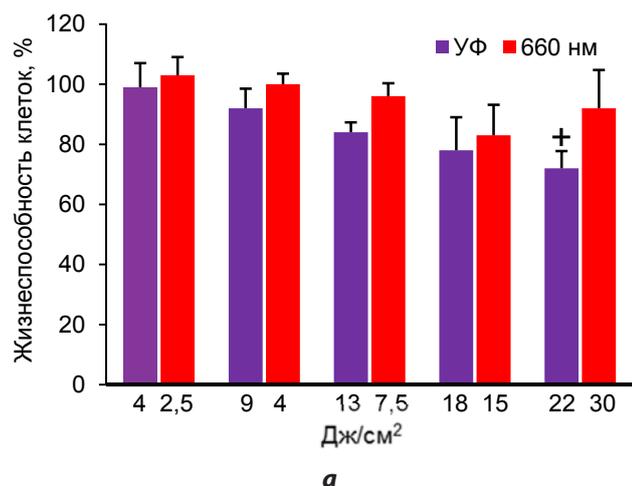
УФ-излучение оказало статистически значимое ингибирующее влияние на развитие HLF-клеток при дозе 22 Дж/см<sup>2</sup>; таким образом, предельной безопасной дозой данного излучения была 18 Дж/см<sup>2</sup> (рис. 3а). Однако данная доза имела большую ошибку среднего, и нами была принята доза УФ-излучения 9 Дж/см<sup>2</sup> как индифферентная для данного типа клеток. Излучение светодиода с длиной волны 660 нм не вызывало статистически значимого снижения жизнеспособности клеток до дозы 30 Дж/см<sup>2</sup> (рис. 3а) и в данной мощности было использовано для фотоактивации хлорина е6.

МТТ-тест в группе с применением фотодинамического фотосенсибилизатора хлорина е6 показал статистически значимые изменения жизнеспособности клеток HLF за счёт фотосенсибилизирующего действия. В концентрациях 1,6–6,3 мкг/мл хлорин е6 обладал

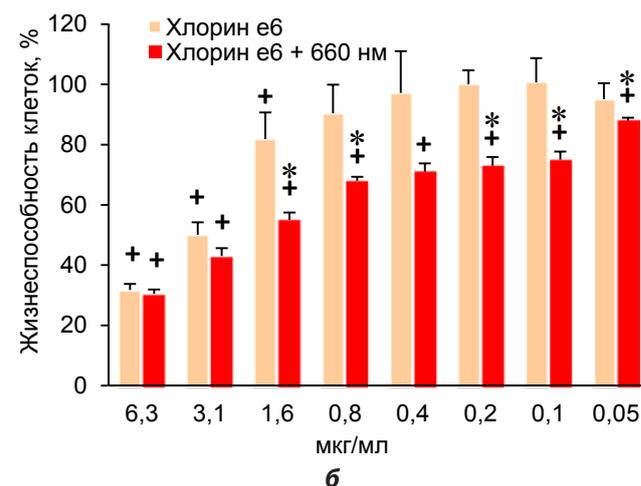
**ТАБЛИЦА 1**  
**СОСТАВ ПОЛУЧЕННЫХ ЭМУЛЬСИЙ**  
**ФУРАНОКУМАРИНОВ БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО**

Состав образца эмульсии № 1 (мас. %)				
Вода	Персиковое масло	8-МОП	Твин-80	
82,7	15,15	0,1	2,05	
Состав образца эмульсии № 2 (мас. %)				
Вода	Глицерин	Персиковое масло	8-МОП	Лецитин
81,3	2,12	14,89	0,1	1,63

**TABLE 1**  
**COMPOSITION OF OBTAINED EMULSIONS**  
**OF FURANOCOUMARIN FROM SOSNOWSKY'S HOGWEED**



**РИС. 3.**  
Изменение жизнеспособности клеток HLF под действием различных доз УФ (365 нм) и красного (660 нм) излучения (а); фотодинамическое воздействие хлорина е6 на клетки HLF (б): + – статистически значимые различия со значениями контрольной группы, без внесения тестируемых веществ и облучения; \* – статистически значимые различия со значениями без облучения при той же концентрации хлорина е6



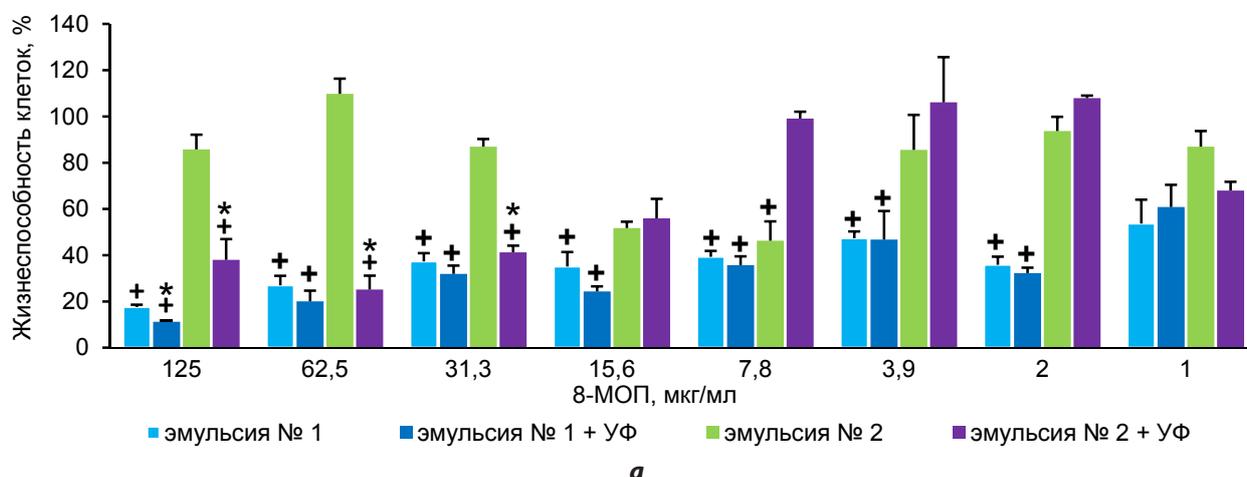
**FIG. 3.**  
Change in the viability of HLF cells under various doses of ultraviolet (365 nm) and red (660 nm) radiation (а); photodynamic effect of chlorin e6 on HLF cells (б): + – statistically significant differences from the values in the control group, without the test substances introduction and irradiation; \* – statistically significant differences from the values without irradiation and at the same concentration of chlorin e6

выраженной токсичностью в отношении клеток HLF, так как при данных концентрациях жизнеспособность клеток была статистически значимо снижена относительно группы негативного контроля в обоих режимах культивирования (рис. 3б). Начиная с концентрации хлорина еб 1,6 мкг/мл начинало проявляться фотосенсибилизирующее действие хлорина, так как здесь жизнеспособность клеток была статистически значимо меньше ( $p < 0,01$ ), чем при темновом режиме (рис. 3б). При более низких концентрациях хлорина еб его фототоксичность продолжала присутствовать во всех разведениях (0,05–0,8 мкг/мл), о чём говорит низкая жизнеспособность клеток (на уровне 68–75 %), имевшая статистически значимые отличия от таковой в группе клеток, получивших хлорин в тех же концентрациях, но не подвергшихся облучению светодиодом (рис. 3б). При концентрации хлорина еб 0,4 мкг/мл и облучении статистически значимых

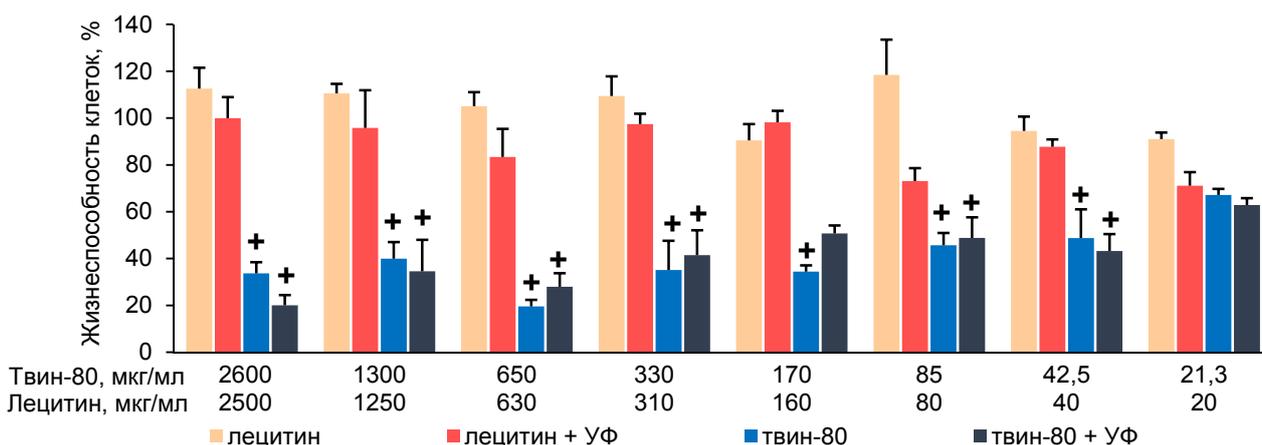
различий с темновым режимом зафиксировано не было, однако относительно интактных клеток наблюдалась более низкая жизнеспособность при  $p < 0,001$  (рис. 3б).

Из рисунка 4а видно, что эмульсия № 1 оказывает цитотоксическое действие на клетки в достаточно низких концентрациях. При этом видно, что нет существенной разницы в выживаемости клеток без УФ-облучения и после его воздействия. До концентрации в среде 8-МОП 2 мкг/мл эмульсия № 1 проявляет статистически значимую цитотоксичность. Однако если учесть собственную токсичность твина-80 (рис. 4б), то видно, что она повторяет в целом токсичность эмульсии № 1.

Эмульсия № 2 без УФ-облучения не оказывала токсического действия на клетки. В отличие от эмульсии № 1, в составе эмульсии № 2 в качестве эмульгатора использовался лецитин, который не проявил собственной цитотоксичности в исследованных концентрациях. Лeci-



а



б

РИС. 4.

Жизнеспособность клеток HLF по данным МТТ-теста при воздействии эмульсионных фуранокумаринов борщевика Сосновского (а) и использованных эмульгаторов (б) (темновая и фотоиндуцированная токсичность): + – статистически значимые различия со значением контрольной группы, без внесения тестируемых веществ и облучения; \* – статистически значимые различия со значением без УФ-облучения при той же концентрации тестируемых веществ

FIG. 4.

Viability of HLF cells according to the MTT test under the influence of emulsion furanocoumarins from Sosnowsky's hogweed (а) and of used emulsifiers (б) (dark and photo-induced toxicity): + – statistically significant differences from the values in the control group, without the test substances introduction and irradiation; \* – statistically significant differences from the values without UV irradiation and at the same concentration of test substances

тин, исследованный изолированно от других компонентов эмульсии, не вызывал статистически значимых изменений жизнеспособности культуры HLF как в условиях темноты, так и при УФ-облучении (рис. 4б).

При использовании эмульсии № 2 в сочетании с УФ можно наблюдать явное фототоксическое действие в отношении клеток при концентрациях 8-МОП 125, 62,5 и 31,3 мкг/мл. В данных концентрациях эмульсия № 2 снижала жизнеспособность клеток до  $38 \pm 9$ ,  $25 \pm 6$  и  $41 \pm 3$  % соответственно против  $86 \pm 6$  % ( $p < 0,01$ ),  $110 \pm 1$  % ( $p < 0,001$ ) и  $87 \pm 3$  % ( $p < 0,001$ ) в тех же концентрациях, но в условиях темноты (рис. 4б).

Относительно интактных клеток негативного контроля клетки, получившие эмульсию № 2 в фоторежиме, также имели статистически значимо более низкие показатели жизнеспособности. Так при концентрациях 8-МОП 31,3, 62,5 и 125 мкг/мл и УФ-облучении жизнеспособность клеток была статистически значимо ниже, чем в контроле при уровне статистической значимости 0,017, 0,0048 и 0,018 соответственно (рис. 4а).

При более низких концентрациях (1–15,6 мкг/мл) эмульсия № 2 не угнетала жизнеспособности клеток как в условиях темноты, так и при воздействии УФ. В связи с этим можно заключить, что концентрация 8-МОП 31,3 мкг/мл для данного типа клеток оказалась предельной для реализации фототоксического действия эмульсии № 2.

Флуоресцентная микроскопия показала, что в большом проценте случаев клетки теряли жизнеспособность вследствие апоптоза (рис. 5). Апоптотические клетки на ранних и поздних стадиях были обнаружены во всех экспериментальных группах. Без вмешательства в культуру клеток процент клеток в состоянии апоптоза составил  $7 \pm 3$  %, после УФ-облучения ( $9 \text{ Дж/см}^2$ ) он увеличился до  $15 \pm 3,5$  %, но это увеличение не было статистически значимым. Отличительной особенностью клеток с признаками апоптоза в группе с эмульсией № 2 и хлорином е6 после фотоактивации было наличие пузырьков на клеточной мембране. Почти все клетки этих групп имели этот признак после облучения (рис. 5). Наибольшее количество апоптотических клеток можно было наблюдать в группе с эмульсией № 2 после УФ-облучения, где  $84 \pm 6$  % всех клеток имели признаки апоптоза. Некротические клетки с кариорексисом и монотонной красной и бурой цитоплазмой встречались наиболее обширно в группах с эмульсией № 1 и твином-80 в 25 % и 28 % случаев соответственно.

При этом количество клеток с признаками апоптоза и некроза статистически значимо не увеличивалось при УФ-облучении (рис. 5). Увеличение клеток с призна-

ками апоптоза и некроза при воздействии УФ-облучения на клетки, обработанные эмульсией № 2, было схоже с таковым при воздействии хлорина е6, когда после облучения красным светом в среднем  $55 \pm 2$  % клеток были в состоянии апоптоза, а  $14 \pm 1$  % – в состоянии некроза. В группе с обработкой лецитином в концентрации 2,5 мг/мл пузырьки на клеточной мембране были крайне редки, и морфологическая картина данной группы не изменилась после УФ-облучения.

Введение лецитина в среду с клетками приводило к появлению  $24 \pm 2$  % клеток с признаками апоптоза (рис. 5). В то же время УФ-облучение мало изменило морфологию клеток при внесении лецитина при наличии  $40 \pm 8$  % клеток в состоянии апоптоза.

Концентрация полумаксимального ингибирования 8-МОП в составе эмульсии № 1 не уменьшалась, а увеличивалась при облучении клеток УФ (табл. 2), что, по видимому, было обусловлено преобладающей для данной эмульсии токсичностью твина-80, которая не позволила выявить фотосенсибилизирующее действие 8-МОП *in vitro*.

Эмульсия № 2 реагировала на УФ-облучение и выражено снижала жизнеспособность клеток. При отсутствии УФ эмульсия № 2 оказалась не токсична для клеток, и  $IC_{50}$  в темноте для данной эмульсии не достигалась (табл. 2).

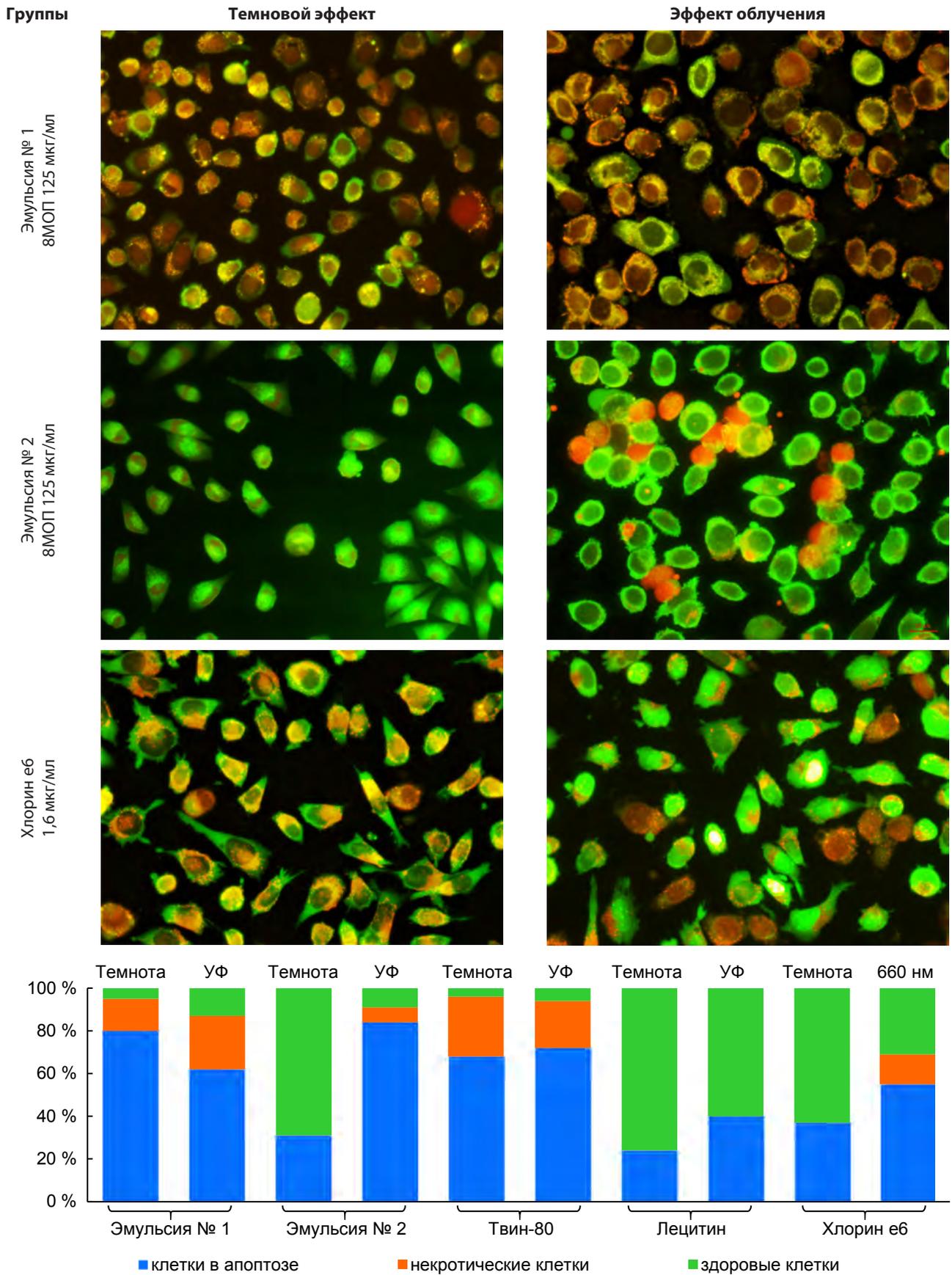
## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, эмульсия № 2 оказывает фототоксическое действие за счёт содержащихся в ней фуранокумаринов борщевика Сосновского и не токсична для клеток человека в отсутствие УФ-излучения. Эмульсия № 1 за счёт содержания твина-80 имеет собственную цитотоксичность. Твин-80, как было показано ранее, имеет мембранотоксические свойства [23]. Тем не менее, токсичность твина-80 не отменяет наличия у эмульсии № 1 фотоиндуцированной токсичности, так как *in vitro* токсичность твина-80 может её перекрывать. Разработка стабильной эмульсионной формы в нашем исследовании была направлена на перспективу использования фуранокумаринов *in vivo* с целью создать доступную и простую в изготовлении лекарственную форму для фотохимиотерапии [24]. Исследованная эмульсионная форма позволяет преодолеть трудности, связанные с гидрофобностью молекул фуранокумаринов, и эффективно стабилизирует их в виде жидкой гетерогенной системы [25]. Лецитин, использованный для создания эмульсии № 2, проявил себя как фотонезависимый компонент, что со-

**ТАБЛИЦА 2**  
**ОТНОШЕНИЕ ТЕМНОВОЙ И ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ (МКГ/МЛ) ПОЛУМАКСИМАЛЬНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ( $IC_{50 \text{ ТЕМН}}/IC_{50 \text{ УФ/660}}$ ) ДЛЯ 8-МОП В СОСТАВЕ ЭМУЛЬСИЙ, ЭМУЛЬГАТОРОВ И ХЛОРИНА Е6**

Эмульсия № 1 (8-МОП)	Твин-80	Эмульсия № 2 (8-МОП)	Лецитин	Хлорин е6
1,2/10,5	51/69,5	-/36,8	-/-	4/2

**TABLE 2**  
**RATIO OF DARK AND PHOTOINDUCED CONCENTRATION (MG/ML) OF HALF MAXIMAL INHIBITION ( $IC_{50 \text{ DARK}}/IC_{50 \text{ UV/660}}$ ) FOR 8-MOP IN EMULSIONS, EMULSIFIERS AND CHLORIN E6**



**РИС. 5.**  
Морфология и количественная оценка клеток HLF с признаками апоптоза и некроза при воздействии фотосенсибилизатора в темноте и при фотоактивации (объяснение в тексте)

**FIG. 5.**  
Morphology and quantitative evaluation of HLF cells with signs of apoptosis and necrosis under the influence of photosensitizers in the dark and upon photoactivation (explanation in the text)

гласуется с данными литературы [26], и поэтому не препятствовал фототоксичному эффекту фуранокумаринов.

Несмотря на то, что борщевик Сосновского является опасным интрадукцентом во многих регионах мира, тем не менее, его физиологические особенности и химический состав делают его уникальным и доступным источником сырья для получения высокоактивных фотосенсибилизаторов, которые могут стать альтернативой фталоцианинам в борьбе против различных заболеваний, включая новообразования, требующих использования фотоактивных материалов [16]. Как показало наше исследование, фуранокумарины борщевика Сосновского, в отличие от классического фотосенсибилизатора хлорофилла а, оказывают фототоксическое действие на изолированные клетки – преимущественно за счёт активации апоптоза (рис. 5). Характерным морфологическим признаком апоптоза клеток под влиянием фуранокумаринов борщевика Сосновского было наличие пузырьков на цитоплазматической мембране. Возможно, это дополняет механизм фотоцитотоксичности фуранокумаринов борщевика и говорит об их мембранотоксическом действии [27]. Такой же механизм фототоксичности присущ фотосенсибилизаторам, производным порфирина, которым для активации необходимы кислород и активатор – свет [28]. Однако механизм фотосенсибилизирующего действия фуранокумаринов связан с образованием под действием УФ-излучения диапазона А-ковалентных моноаддуктов и межщепочечных сшивок в ДНК между пиримидиновыми основаниями [29]. Этот механизм не является классическим фотодинамическим механизмом, присущим хлорофиллу а и другим фотосенсибилизаторам порфиринового ряда.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные экспериментальные эмульсионные формы фуранокумаринов борщевика Сосновского являются собой пример перспективных лекарственных фотосенсибилизаторов растительного происхождения для фототерапии различных заболеваний в сфере дерматологии и онкологии.

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей. *Соросовский образовательный журнал*. 1996; 8: 32-40. [Mironov AF. Photodynamic cancer therapy: A novel effective method for the malignant tumors diagnostics and treatment. *Soros Educational Journal*. 1996; 8: 32-40. (In Russ.)].
2. Andreeva LV. Sosnowsky hogweed: New ways to use. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*. 2020; 613. doi: 10.1088/1755-1315/613/1/012006

3. Nielsen C, Ravn HP, Nentwig W, Wade M. *The giant hogweed best practice manual. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe*. Denmark, Hoersholm: Forest & Landscape, Denmark; 2005.
4. Bartnik M, Slawinska-Brych A, Zurek A, Kandefer-Szerszen M, Zdzisinska B. 8-methoxypsoralen reduces AKT phosphorylation, induces intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and suppresses cell growth of SK-N-AS neuroblastoma and SW620 metastatic colon cancer cells. *J Ethnopharmacol*. 2017; 207: 19-29. doi: 10.1016/j.jep.2017.06.010
5. Tutin TG, Heywood UH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, *Flora Europaea 2*. UK: Cambridge University Press; 1968.
6. Fathallah N, Raafat MM, Issa MY, Abdel-Aziz MM, Bishr M, Abdelkawy MA, et al. Bio-guided fractionation of prenylated benzaldehyde derivatives as potent antimicrobial and antibiofilm from *Ammi majus* L. fruits-associated *Aspergillus amstelodami*. *Molecules*. 2019; 24(22): 4118. doi: 10.3390/molecules24224118
7. Cao H, Hearst JE, Corash L, Wang Y. LC-MS/MS for the detection of DNA interstrand cross-links formed by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in human cells. *Anal Chem*. 2008; 80(8): 2932-2938. doi: 10.1021/ac7023969
8. Wang X, Peng P, Pan Z, Fang Z, Lu W, Liu X. Psoralen inhibits malignant proliferation and induces apoptosis through triggering endoplasmic reticulum stress in human SMMC7721 hepatoma cells. *Biol Res*. 2019; 52(1): 34. doi: 10.1186/s40659-019-0241-8
9. Li S, Tu H. Psoralen inhibits the proliferation and promotes apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human osteosarcoma cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2022; 60(1): 101-109. doi: 10.5603/FHC.a2022.0010
10. Baroli B, López-Quintela MA, Delgado-Charro MB, Fadda AM, Blanco-Méndez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *J Control Release*. 2000; 69(1): 209-218. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00309-6
11. Wu JY, Li YJ, Liu TT, Ou G, Hu XB, Tang TT, et al. Microemulsions vs chitosan derivative-coated microemulsions for dermal delivery of 8-methoxypsoralen. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14: 2327-2340. doi: 10.2147/IJN.S191940
12. Oliveira CA, Gouvêa MM, Antunes GR, Freitas ZMF, Marques FFC, Ricci-Junior E. Nanoemulsion containing 8-methoxypsoralen for topical treatment of dermatoses: Development, characterization and ex vivo permeation in porcine skin. *Int J Pharm*. 2018; 547(1-2): 1-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.053
13. Moore RB, Xiao Z, Owen RJ, Ashforth R, Dickey D, Helps C, et al. Photodynamic therapy of the canine prostate: intra-arterial drug delivery. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2008; 31(1): 164-176. doi: 10.1007/s00270-007-9213-4
14. Osaki T, Yokoe I, Sunden Y, Ota U, Ichikawa T, Imazato H, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid in photodynamic detection and photodynamic therapy in veterinary medicine. *Cancers*. 2019; 11(4): 495. doi: 10.3390/cancers11040495
15. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat*. 2008; 7(4): 309-320. doi: 10.1177/153303460800700405
16. Foster TH, Giesselman BR, Hu R, Kenney ME, Mitra S. Intratumor administration of the photosensitizer pc 4 affords photodynamic therapy efficacy and selectivity at short drug-light intervals. *Transl Oncol*. 2010; 3(2): 135-141. doi: 10.1593/tlo.09295

17. Shafirstein G, Bellnier D, Oakley E, Hamilton S, Potasek M, Beeson K, et al. Interstitial photodynamic therapy – A focused review. *Cancers*. 2017; 9(2): 12. doi: 10.3390/cancers9020012
18. Агеев В.П., Шляпкина В.И., Куликов О.А., Заборовский А.В., Тарарина Л.А. Качественный и количественный анализ основных производных псоралена сока борщевика Сосновского. Фармация. 2022; (3): 10-17. [Ageev VP, Shlyapkina VI, Kulikov OA, Zaborovskiy AV, Tararina LA. Qualitative and quantitative analysis of the main psoralen derivatives in the juice of Sosnowsky's hogweed. *Pharmacy*. 2022; (3): 10-17. (In Russ.)]. doi: 10.29296/25419218-2022-03-02
19. Lukowski JK, Weaver EM, Hummon AB. Analyzing liposomal drug delivery systems in three-dimensional cell culture models using MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Chem*. 2017; 89(16): 8453-8458. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02006
20. Yoon HY, Koo H, Choi KY, Lee SJ, Kim K, Kwon IC, et al. Tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photodynamic imaging and therapy. *Biomaterials*. 2012; 33(15): 3980-3989. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.016
21. Nasr S, Rady M, Sebak A, Goma I, Fayad W, Gaafary ME, et al. A naturally derived carrier for photodynamic treatment of squamous cell carcinoma: *In vitro* and *in vivo* models. *Pharmaceutics*. 2020; 12(6): 494. doi: 10.3390/pharmaceutics12060494
22. Mazur Y, Lavie G. *Heliantrone derivatives as anti-cancer agents*: Patent US 6229048 B1. 2001.
23. Кушназарова Р.А., Миргородская А.Б., Волошина А.Д., Любина А.П., Кузнецов Д.М., Ленина О.А., и др. Бинарные системы дикарбаматное ПАВ – Твин-80: агрегационное поведение, антимикробная активность и мембранотропные свойства. *Жидкие кристаллы и их практическое использование*. 2022; 22(2): 6-18. [Kushnazarova RA, Mirgorodskaya AB, Voloshina AD, Lyubina AP, Kuznetsov DM, Lenina OA, et al. Dicarbamate surfactant – tween 80 binary systems: Aggregation, antimicrobial activity and membranotropic properties. *Liquid Crystals and their Application*. 2022; 22(2): 6-18. (In Russ.)]. doi: 10.18083/LCAppl.2022.2.6
24. Halpern SM, Anstey AV, Dawe RS, Diffey BL, Farr PM, Ferguson J, et al. Guidelines for topical PUVA: A report of a workshop of the British photodermatology group. *Br J Dermatol*. 2000; 142(1): 22-31. doi: 10.1046/j.1365-2133.2000.03237.x
25. Wang D, McLaughlin E, Pfeffer R, Lin YS. Adsorption of oils from pure liquid and oil-water emulsion on hydrophobic silica aerogels. *Separation and Purification Technology*. 2012; 99: 28-35. doi: 10.1016/j.seppur.2012.08.001
26. Johnson W Jr, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety assessment of lecithin and other phosphoglycerides as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2020; 39(2): 5-25. doi: 10.1177/1091581820953123
27. Diekmann J, Theves I, Thom KA, Gilch P. Tracing the photoaddition of pharmaceutical psoralens to DNA. *Molecules*. 2020; 25(22): 5242. doi: 10.3390/molecules25225242
28. Mang R, Stege H, Krutmann J. Mechanisms of phototoxic and photoallergic reactions. In: Johansen J, Frosch P, Lepoittevin JP (eds.). *Contact dermatitis*. Springer; 2011: 155-163. doi: 10.1007/978-3-642-03827-3\_8
29. Bethea D, Fullmer B, Syed S, Seltzer G, Tiano J, Rischko C, et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J Dermatol Sci*. 1999; 19(2): 78-88. doi: 10.1016/S0923-1811(98)00064-4

#### Сведения об авторах

**Шляпкина Василиса Игоревна** – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: shlyapkina.98@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5248-0136>

**Куликов Олег Александрович** – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0739-3981>

**Бродовская Екатерина Павловна** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: ekbrodovskaya@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-5145-1029>

**Аль-хадж Аюб Амина Мухаммед Мадюановна** – инженер лаборатории фармакокинетики и таргетной фармакотерапии, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: amina.aioub1@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2793-6760>

**Агеев Валентин Павлович** – младший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и таргетной фармакотерапии, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: valeageev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5152-5358>

**Пятаев Николай Анатольевич** – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: pyataevna@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9688-7640>

#### Information about the authors

**Vasilisa I. Shlyapkina** – Postgraduate at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology with the Course of Pharmaceutical Technology, National Research Ogarev Mordovia State University, e-mail: shlyapkina.98@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5248-0136>

**Oleg A. Kulikov** – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology with the Course of Pharmaceutical Technology, National Research Ogarev Mordovia State University, e-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0739-3981>

**Ekaterina P. Brodovskaya** – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, National Research Ogarev Mordovia State University, e-mail: ekbrodovskaya@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-5145-1029>

**Amina M. Al-khadj Aioub** – Engineer at the Laboratory of Pharmacokinetics and Targeted Pharmacotherapy, National Research Ogarev Mordovia State University, e-mail: amina.aioub1@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2793-6760>

**Valentin P. Ageev** – Junior Research Officer at the Laboratory of Pharmacokinetics and Targeted Pharmacotherapy, National Research Ogarev Mordovia State University, e-mail: valeageev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5152-5358>

**Nikolay A. Pyataev** – Dr. Sc. (Med.), Head of the Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, National Research Ogarev Mordovia State University, e-mail: pyataevna@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9688-7640>