

Статья

Rosa platyacantha Schrenk из Казахстана является природным источником биоактивных соединений, имеющих косметическое значение.

Асхат Сабитов ^{1#}, Катажина Гавел-Бембен ^{2#*}, Зуриядда Сакипова ¹, Марселина Стжепек-Гомулка ², Уляна Хоян ², Эльмира Сатбаева ¹, Казимеж Гловняк ², Агнешка Людвичук ³

¹ Казахский национальный медицинский университет имени Асфендиярова, ул. Толе би, 94, г. Алматы, 050012, Республика Казахстан ; asxam78@gmail.com (AC), sakipova.z@kaznmu.kz (ЗС), satbaeva.e@kaznmu.kz (ИС)

² Кафедра косметологии, Университет информационных технологий и менеджмента в Жешуве, Сухарского 2, 35-225, Жешув, Польша ; kagawel@wsiz.edu.pl (KG-B.), mstrzepek@wsiz.edu.pl (MS-G.), uhoian@wsiz.edu.pl (УН), kglowniak@wsiz.edu.pl (KG)

³ Независимая лаборатория химии натуральных продуктов, кафедра фармакогнозии, Люблинский медицинский университет, ул. Ходзки 1, 20-093 Люблин, Польша; aludwiczuk@pharmacognosy.org (AL)

* Переписка : kagawel@wsiz.edu.pl; +48 178661412 (КГ-Б.)

Эти авторы внесли одинаковый вклад.

Образец цитирования:

Фамилия, Ф.; Фамилия, Ф.;
Фамилия, Ф. Титул. Молекулы
2021, 26, x.
<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Академический редактор: Имя
Фамилия

Резюме: Растения, принадлежащие к роду *Роза*, известны своим высоким содержанием биоактивных молекул и широким спектром лечебных и косметических действий. *Роза платьяканта* Шренк – вид дикого типа, широко распространенный в горных районах Казахстана. Фитохимический состав, а также биологическая активность *R. platyacantha* Экстракты до сих пор полностью не исследованы. В этом исследовании различные части *R. platyacantha*, собранные в Алматинской области, Казахстан, использовали для приготовления пяти водно-спиртовых экстрактов (R1-R5). Экстракты сравнивали по содержанию фитохимических веществ и выбранной биологической активности, важных для потенциального косметического применения *R. platyacantha*. Экстракт R3, приготовленный из цветочных почек, показал наиболее значительный антиоксидантный и ингибирующий потенциал тирозиназы, снижающий монофенолазную и дифенолазную активность тирозиназы. Экстракт R3 также проявлял ингибирующую коллагеназу активность и цитотоксичность в отношении клеток меланомы человека A375, будучи менее цитотоксичным в отношении нераковых кератиноцитов кожи HaCaT. Анализ фракций, полученных из экстрактов R3, показал, что кверцетин, кемпферол, рутин, и их производные, скорее всего, ответственны за ингибирующие свойства тирозиназы экстрактов *R. platyacantha*.

Ключевые слова: роза платьяканта ; ВЭЖХ/ESI-QTOF-MS, антиоксидант; тирозиназа, эластаза, коллагеназа, меланома, цитотоксичность *in vitro*

Дата получения
Принято: дата
Опубликовано: дата

Примечание издателя: MDPI остается нейтральным в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.



Copyright: © 2021 авторы. Представлено для возможной публикации в открытом доступе на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Введение

Виды, принадлежащие к роду *Роза*, являются одними из самых популярных декоративных и режущих растений на планете. Род *Rosa* состоит из более чем 200 видов, однако только около 10-15 видов использовались для размножения современных культурных сортов, что делает остальные виды дикого типа менее изученными [1]. Экстракты и соединения, выделенные из различных видов шиповника, широко используются в качестве традиционных лекарственных средств [2,3] и исследуются при различных заболеваниях, таких как кожные заболевания [4], гепатотоксичность [5], почечные нарушения [6], диарея [7], артрит [8], диабет [9], гиперлипидемия [10] и рак [11]. Спиртовые экстракты различных видов шиповника также показали некоторую противовирусную активность без цитотоксических эффектов [12]. Противораковое действие *Розы* объясняется богатым содержанием антиоксидантов. Показано, что основными компонентами экстракта являются нейтральные и кислые фенолы, оказывающие антипролиферативное и апоптотическое действие на раковые клетки [13]. Экстракты розы также могли бы иметь противоположный эффект и повышать выживаемость клеток; например, экстракты *R. canina* содержат изофлавоновые фитоэстрогены, которые увеличивают выживаемость эстроген-зависимых раковых клеточных линий, таких как клетки рака молочной железы (MCF-7) *in vitro* [14]. Экстракты из других видов *Rosa*, таких как *R. rugosa*, также содержат другие активные соединения, влияющие на эпигенетику раковых клеток, ингибирующие активность гистон-ацетилтрансферазы и индуцирующие апоптоз клеточных линий рака предстательной железы [15].

Виды *Роза* также являются особенно богатым источником активных ингредиентов для косметической промышленности. *R. alba*, *R. borboniana*, *R. canina*, *R. centifolia*, *R. damascena*, *R. davurica*, *R. floribunda*, *R. gallica*, *R. hybrida*, *R. moschata*, *R. multiflora*, *R. rubiginosa*, *R. rugosa* и *R. spinosissima* входят в число видов, которые в настоящее время используются в косметических продуктах и обладают научно доказанной активностью по уходу за кожей [16]. Например, спиртовой экстракт цветков *R. multiflora* предотвращает индуцированные ультрафиолетом (УФ) биохимические повреждения, ведущие к фотостарению, за счет снижения количества активных форм кислорода (АФК), интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-8 и матриксной металлопротеиназы (ММП)-1. уровней [17]. Недавно было показано, что порошок шиповника *R. canina*, содержащий семена и скорлупу, увеличивает продолжительность жизни клеток, уменьшает морщины, увлажняет и эластичность кожи [18]. Экстракт лепестков *R. gallica* снижал экспрессию ММП-1, индуцированного солнечным УФ-излучением, что является отличительным признаком образования морщин [19]. Экстракты и соединения, выделенные из *R. canina*, *R. gallica* и *R. rugosa*, были тщательно изучены для оценки их эффективности в качестве потенциальных ингредиентов для осветления кожи [20-22]. Было обнаружено, что содержащиеся в избытке в экстрактах шиповника полифенолы, особенно кверцетин, кемпферол и эллаговая кислота, обладают ингибирующей активностью *in vitro* в отношении тирозиназы, фермента, ответственного за синтез меланина [22].

Фитохимический состав рода *Rosa* различается у разных и одних и тех же видов, особенно в отношении концентрации витамина С и фенольных соединений, и зависит от географического положения, экологии, состава почвы и других факторов окружающей среды. [23]. Недавние исследования Dani et al. показали, что фитохимический состав *Rosa sp.* также зависит от развития и старения цветков [24]. Наиболее изученными частями растений шиповника являются плоды шиповника, которые известны как богатый источник природных антиоксидантов, например, ПНЖК (полиненасыщенных жирных кислот), таких как линолевая кислота, а также флавоноидов, тритерпеноидов и фитостеролов [25]. Галактолипиды, которые также содержатся в плодах шиповника, проявляют некоторую противовоспалительную и

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

противоопухолевую активность [26]. Недавно было показано, что цветочные почки *R. rugosa* содержат кислые полисахариды с антиоксидантными и омолаживающими свойствами [27], а также нейроактивные депсид-глюкозиды, флавоноиды и дубильные вещества [28]. Флавоноиды, включая производные кемпферола и кверцетина, также были обнаружены в цветочных почках *R. damascena* [29]. В листьях различных видов *шиповника* обнаружено значительное количество полифенолов, составляющее от $5,7 \pm 0,08$ до $15,2 \pm 0,21$ % от сухой массы [30]. У *R. canina* содержание полифенолов выше в листьях, чем в плодах [31].

В настоящем исследовании мы изучили фитохимический состав и выбранную косметическую активность *Rosa platyacantha* Schrenk, произрастающей в горах Заилийского Алатау, Северного Тянь-Шаня (Алматы, Казахстан). Этот вид *Rosa* до сих пор не охарактеризован в научной литературе. Кроме того, очевидно, что растения, произрастающие в неблагоприятных природных условиях, например, в горах Алматинской области, в целом богаты фитохимическими соединениями с широким спектром биологической активности, включая антиоксидантные, противовоспалительные и УФ-защитные свойства [22, 32] . , 33, 34]. Экстракты таких растений являются потенциально интересным источником активных ингредиентов для косметических средств, защищающих кожу от вредного воздействия факторов окружающей среды, включая загрязнение воздуха и ультрафиолетовое излучение. По этой причине в этом исследовании экстракты *R. platyacantha*, приготовленные из различных частей растения, были исследованы на предмет их антиоксидантного потенциала, ингибирующих свойств эластазы, коллагеназы и тирозиназы, а также антимеланомной активности *in vitro*. Экстракт цветочных почек, обладающий наиболее значительными свойствами ингибирования тирозиназы, был фракционирован для идентификации соединений, ответственных за ингибирование тирозиназы.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Фитохимический состав и экстракты антиоксидантов из различных частей *R. platyacantha*

Водно-спиртовые экстракты, приготовленные из цветков, листьев, бутонов, листьев со стеблями и цветков без лепестков *R. platyacantha* (R1-R5 соответственно), сравнивали по содержанию общих фенольных соединений и флавоноидов. Экстракты P2-P5 характеризовались одинаковым содержанием фенолов (14,53-13,30 мг ОЭ/г сухой массы, с.в.), тогда как экстракт P1 содержал значительно меньшее количество этих соединений (8,61 мг ОЭ/г сухой массы). Содержание флавоноидов было сопоставимо между экстрактами и варьировало от 2,03 до 2,49 мкг/г сухой массы (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение общего содержания фенолов и флавоноидов и антирадикальной активности экстрактов R1-R5 из различных частей *R. platyacantha*; каждое значение представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$)

	R1	R2	R3	R4	R5	Витамин С
Общий фенол (мг GAE/г сух.в.)	$8,61 \pm 0,18$	$14,53 \pm 0,18$	$13,30 \pm 0,16$	$14,05 \pm 0,28$	$13,68 \pm 0,27$	-
Флавоноиды (мг QE/г сухой массы)	$2,42 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,03$	$2,42 \pm 0,05$	$2,49 \pm 0,09$	$2,03 \pm 0,06$	-
Удаление DPPH (IC ₅₀ , мкг /мл)	$2,77 \pm 0,05$	$1,68 \pm 0,25$	$1,50 \pm 0,19$	$1,59 \pm 0,14$	$1,10 \pm 0,34$	$0,96 \pm 0,05$
Удаление ABTS	$16,16 \pm 1,26$	$7,16 \pm 0,22$	$10,83 \pm 0,85$	$9,89 \pm 0,83$	$9,21 \pm 0,54$	$0,97 \pm 0,06$

(IC₅₀, мкг/мл)

Фенольные соединения, особенно флавоноиды, считаются наиболее активной группой природных соединений с широким спектром применения в медицине, пищевых продуктах и косметике [35]. Как показали несколько исследователей, фенольные соединения и флавоноиды являются мощными антиоксидантами, поэтому они могут служить эффективными поглотителями активных форм кислорода (АФК) [36]. Хотя низкие количества АФК важны для внутриклеточной передачи сигналов, повышенные уровни АФК могут вызывать повреждение ДНК, липидов и белков и, таким образом, приводить к развитию преждевременного старения кожи, нарушений пигментации или рака кожи [37, 38].

Антиоксидантный потенциал экстрактов R1-R5 сначала сравнивали с использованием анализов поглощения радикалов DPPH и ABTS. В обоих методах наибольшая и наименьшая антиоксидантная активность была обнаружена в экстрактах *R. platyacantha* с наибольшим и наименьшим содержанием фенолов соответственно (табл. 1).

Способность экстрактов R1-R5 защищать клетки от повреждающего действия АФК также анализировали *in vitro* с использованием спонтанно иммортализованной линии кератиноцитов клеток человека HaCaT [39]. В этом анализе клетки подвергали воздействию H₂O₂ в присутствии или в отсутствие экстрактов R1-R5 в концентрации 25 и 10 мкг/мл, а образование внутриклеточных АФК контролировали с использованием флуорогенного красителя H₂DCFDA. После диффузии в клетку H₂DCFDA деацетируется клеточными эстеразами и затем окисляется АФК в 2',7'-дихлорфлуоресцеин (DCF) [40]. Как показано на рисунке 1, стимуляция клеток HaCaT с помощью H₂O₂ увеличивала интенсивность флуоресценции DCF примерно в 4 раза, что указывает на увеличение продукции внутриклеточных АФК. Предварительная обработка клеток экстрактами R1-R5 снижала внутриклеточный уровень АФК в 2,5 раза по сравнению с клетками без предварительной обработки. Наблюдаемое снижение внутриклеточного окислительного стресса было сравнимо с известным поглотителем АФК NAC [41].

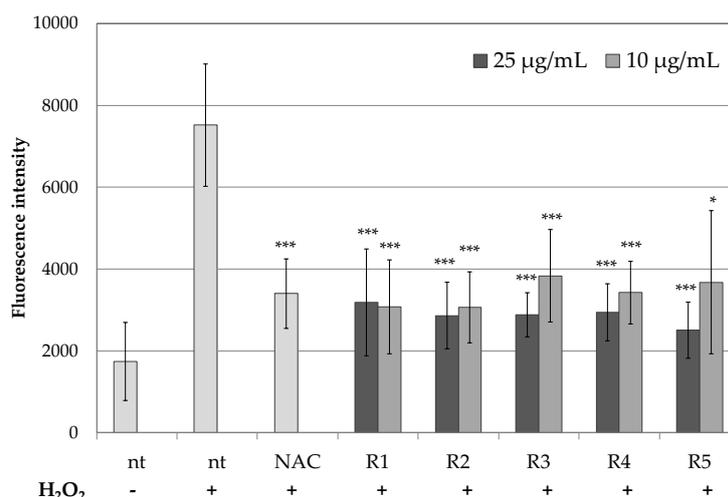


Рисунок 1. Влияние экстрактов *R. platyacantha* R1-R5 на внутриклеточные уровни АФК в кератиноцитах HaCaT, обработанных в течение 60 минут 1 mM H₂O₂; nt – без предварительной обработки, NAC – 2 mM N-ацетилцистеин; значения на графике представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (n=3), *** p<0,001, * p<0,05 по сравнению с образцом «nt + H₂O₂».

2.2. Хроматографический анализ *P. экстракты платиаканты*

Экстракты R1-R5 подвергали анализу ВЭЖХ/ESI-QTOF-MS, и идентифицированные соединения представлены в таблице 2. Хроматограммы доступны в дополнительных материалах (рис. S1). Содержание фитохимических веществ было классифицировано как высокое (+++), умеренное (++) или низкое (+), как показано в Таблице 2.

Таблица 2. Соединения, найденные в *R. экстракты platycantha* R1-R5 после анализа ВЭЖХ/ESI-QTOF-MS в режиме отрицательных ионов

№ т	Время удерживания	Имя	Формула	Молекулярный ион [МН]	Ионы фрагментации	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5
1	1.920	Хинная кислота	$C_7H_{12}O_6$	191.0581	173.0438; 127.0426; 109.0287	+	+	+	+	+
2	2.507	Лимонная кислота	$C_6H_8O_7$	191.0362	173.0119; 111.0086	+	+	+	+	+
3	2,955	Изомер глюкозида галловой кислоты	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0683	271.0432; 169.0143; 125.0230	+	+	-	+	+
4	3.396	Гомоизолимонная кислота	$C_7H_{10}O_7$	205.0373	173.0207; 155.0111; 111.0145	+	-	-	-	-
5	4.092	Галловая кислота	$C_7H_6O_5$	169.0147	125.0258; 107.0141	+	+	+	+	+
6	4.530	Теогаллин	$C_{14}H_{16}O_{10}$	343.0685	191.0497; 127.0389	+	+	+	+	+
7	6.495	Изомер глюкозида галловой кислоты	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0659	169.0139; 125.0222	+	+	+	+	+
8	7.826	производное галловой кислоты	$C_{23}H_{19}O_{18}$	581.0449	313.0490; 169.0104	+	-	+	-	+
9	9.877	Изомер метоксигаллового глюкозида	$C_{14}H_{18}O_{10}$	345.0820	183.0275; 124.0151	+	-	+	-	-
10	10.127	Хлорогеновая кислота	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0867	191.0373; 135.0308; 109.0238	-	+	-	+	+
11	11.639	Метоксигалловый изомер	$C_8H_{10}O_6$	183.0453	168.0215; 124.0238	+	+	+	+	+
12	13.378	Производное эллаговой кислоты	$C_{34}H_{26}O_{22}$	783.0488	300,9905; 275.0111; 249.0302	+	-	+	-	+
13	16.619	Производное эллагитанина	$C_{30}H_{24}O_{25}$	785.0836	300,9934; 275.0111; 249.0375; 169.0107	+	+	+	-	-
14	17.214	Производное эллагитаннина	$C_{34}H_{26}O_{22}$	785.0836	300,9981; 275.0185; 249.0428; 162.0121; 125.0163	+	-	-	-	-
15	17.255	Криптохлорогенный	$C_{16}H_{18}$	353.0496	191.0380;	+	+	-	+	-

171
172
173
174
175
176
177
178
179
180

			O_9		179.0113; 173.0244; 135.0268					
16	17.559	Стриктинин	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633.0723	300,9669; 247,9903; 249.0121; 168,9972; 125.0082	-	+	+	+	+
17	19.218	Бревифолин карбоновая кислота	$C_{13}H_8O_8$	291.0133	247.0116; 205.0041	+	+	+	+	+
18	20.860	Бревифолина карбоксилат	$C_{12}H_7O_6$	247.0235	201.0169; 190.0258; 173.0207; 145.0278; 135.0421	+	+	+	+	+
19	21.130	Метилбревифолинкарбоксилат	$C_{14}H_{10}O_8$	305.0290	273,0069; 245.0075; 217.0119; 189.0166; 161.0237; 145.0269; 133.0273; 117.0349	+	+	+	+	+
20	23.021	Изомер галлиоглюкозида кверцетина	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615.1014	463.0872; 300.0281; 271.0297; 255.0269; 169.0140; 151.0020; 124.0151; 107.0091	+	+	+	+	+
21	23.281	Изомер галлиоглюкозида кверцетина	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615.1014	463.0900; 300.0276; 271.0283; 255.0223; 169.0140; 150,9999; 124.0139	+	-	-	-	+
22	23.951	Глюкозид эллаговой кислоты	$C_{20}H_{16}O_{13}$	463.0584	300,9994; 226,9924; 200.0078; 173.0221; 145.0286; 117.0374	-	-	+	+	+
23	23.997	Кверцетин 3-О глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0896	300.0254; 271.0243; 255.0273; 179.0005; 151.0029; 135.0105; 108.0183	+	+	+	-	-
24	24.351	Эллаговая кислота	$C_{14}H_6O_8$	301.0003	283,9966; 245,0068;	+	-	-	-	-

					201.0123; 173.0243; 145.0273; 117.0332					
25	25.490	Кверцетин глюкуронид	$C_{21}H_{18}O_{13}$	477.0700	301.0350; 255.0315; 178,9994; 151.0048; 107.0153	+	+	+	+	+
26	26.172	Дигаллиоилглюкозид	$C_{22}H_{12}O_{13}$	483.0237	301.0079; 285.0134; 270,9967; 228.0068; 173.0232; 144.0312; 117.0321	+	-	+	-	+
27	26.326	Кверцетин 7-О-глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0896	300.0280; 257.0421; 179.0005; 151.0045; 107.0183	+	-	+	-	+
28	28.380	Изомер галлиоглюкозида кверцетина	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615.1014	301.0386; 255.0328; 179.0003; 169.0139; 151.0065; 125.0231	+	+	+	+	+
29	29.197	Рутина	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1278	463.0905; 300.0289; 271.0273; 255.0265; 179.0031; 151.0050; 107.0139	+	-	-	-	+
30	31.014	Кемпферол рутинозид	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1105	285.0352; 255.0270; 227.0305; 150,9958; 145.0285; 119.0489	+	-	+	+	-
31	34.432	кемпферол	$C_{15}H_{10}O_6$	285.0388	229.0512; 150,9980; 107.0111	+	-	-	-	-

Хроматографический анализ экстрактов, полученных из разных частей *R. Platyacantha*, показал, что наиболее характерными соединениями являются хинная кислота, изомер метоксигалловой кислоты и метилбревифолинкарбоксилат. Изомер метоксигалловой кислоты был самым обильным соединением экстрактов R3 и R5. Содержание хинной кислоты и метилбревифолинкарбоксилата было сопоставимо в экстрактах R1, R2, R4 и сравнительно ниже в экстракте R3.

В то время как хинная и эллаговая кислоты и их производные представляют собой соединения, обычно идентифицируемые в экстрактах различных видов *Rosa*

181

182

183

184

185

186

187

188

189

sp. [42, 43, 44], насколько нам известно, это первое сообщение, указывающее на присутствие производных бревифолина у видов рода *Rosa*.

В литературе очень мало сообщений о химическом составе *R. platyacantha* [45, 46]. В обеих публикациях сообщалось о наличии гидролизуемых дубильных веществ (галлотаннинов и эллагитанинов) в плодах *R. platyacantha*. В метанольном экстракте, полученном из этого растительного сырья, идентифицированы эллаговая и галловая кислоты [45, 46]. Результаты текущих исследований подтверждают наличие обеих кислот и их производных также в экстрактах, полученных из других частей *R. platyacantha*. Впервые подтверждено наличие производных бревифолина. Известно, что последние соединения встречаются в гранате, сладких апельсинах и видах *Zanthoxylum* [47]. Также интересно заметить, что фармакологический профиль бревифолина, как сообщается, аналогичен эллаговой кислоте [48]. С химической точки зрения эллагитанины также могут подвергаться окислению до соединений, содержащих дегидрогексагидрокси фенольную группу, что также сопровождается присутствием бревифолинкарбоновой кислоты [49]. Это соединение было обнаружено также во всех экстрактах, полученных из *R. Platyacantha*.

Среди других характерных компонентов следует отметить наличие производных галловой и хлорогеновой кислот, а также флавоноидов, относящихся к флавонолам, особенно производным кверцетина. Эти соединения известны из научной литературы как эффективные антиоксиданты и ранее были обнаружены в экстрактах других видов шиповника [42, 43, 44, 50]. Обилие хинной кислоты, кверцетина и галловой кислоты, а также их производных в экстрактах *R. platyacantha* объясняет их значительную антиоксидантную активность [51].

2.3 Антиколлагеназная и антиэластазная активность экстрактов *R. platyacantha*

Повышенная активность коллагеназы и эластазы играет ключевую роль в образовании морщин на коже за счет нарушения конфигурации коллагеновых и эластических волокон и последующей потери эластичности кожи. Повышение активности коллагеназы и эластазы обусловлено как внутренними (хронологическими), так и внешними (УФ-излучение) факторами старения [52, 53]. В общем, экстракты *R. platyacantha* были более эффективны в отношении коллагеназы, чем ингибиторы эластазы (рис. 2). Все протестированные экстракты продемонстрировали значительное ингибирование коллагеназы при 100 мкг/мл, при этом экстракт R3 был наиболее активным (ингибирование коллагеназы 38%). Экстракты R1, R2 и R3 значительно снижали активность коллагеназы также при 50 мкг/мл (ингибирование 18-34%). Активность эластазы значительно снижалась только при использовании экстрактов R1, R2 при концентрации 100 мкг/мл (ингибирование 11-13%) и экстракте R4 при 50 мкг/мл (ингибирование 16%)

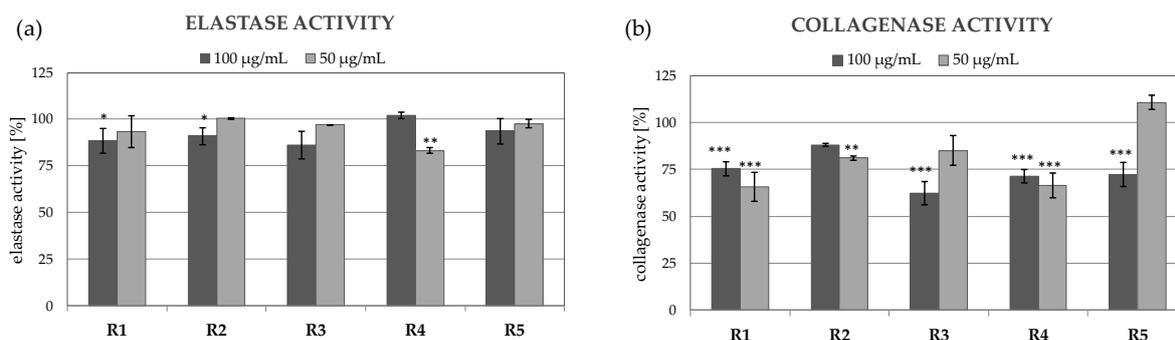


Рисунок 2. Ингибирующая активность эластазы (а) и коллагеназы (б) экстрактов R1-R5 из различных частей *R. platyacantha*; значения на графиках представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение ($n=3$), *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$

На сегодняшний день в растительных экстрактах, в том числе видов шиповника, идентифицировано несколько природных ингибиторов коллагеназы и эластазы. Было показано, что экстракт *R. rugosa* ингибирует активность коллагеназы [53], а экстракт *R. damascena* из лепестков ингибирует эластазу [54]. Экстракты *R. hybrida* и *R. centifolia* показали ингибирующий потенциал в отношении как коллагеназной, так и эластазной активности [55, 56].

2.4 Антитирозиназная активность экстрактов *R. platyacantha*

Использование растительных экстрактов для лечения нарушений пигментации кожи приобрело популярность в последние годы [58]. Тирозиназа (ЕС. 1.14.18.1), ключевой фермент меланогенеза, является наиболее популярной мишенью для осветляющих кожу косметических ингредиентов. Тирозиназа катализирует лимитирующее превращение L-тирозина в L-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА) (монофенолазная активность) и впоследствии в допахинон (дифенолазная активность) [59].

R. platyacantha ингибируют монофенолазную и дифенолазную активность тирозиназы дозозависимым образом, при этом экстракт R3 является наиболее активным. Экстракт R3 в концентрации 100 мкг/мл ингибирует 90% монофенолазную и 38% дифенолазную активность тирозиназы. Экстракты R2 и R4 снижали активность дифенолазы на 20%, но не влияли на монофенолазную активность тирозиназы (рис. 3).

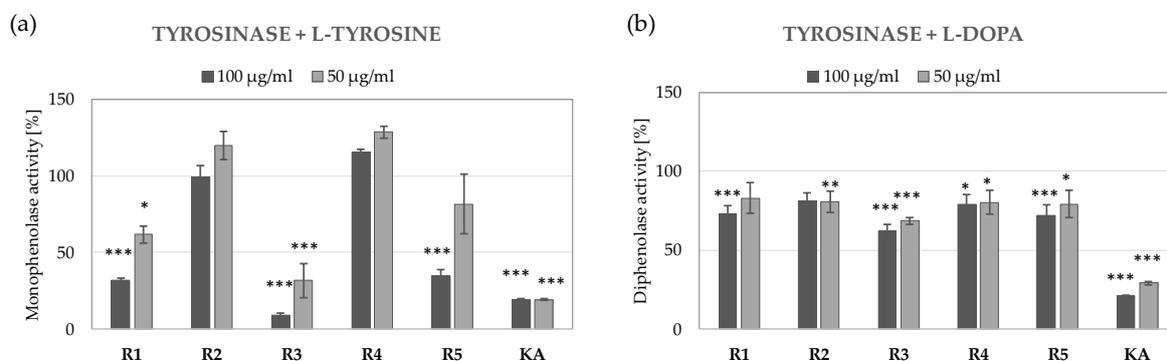


Рис. 3. Ингибирование монофенолазной (а) и дифенолазной (б) активности тирозиназы экстрактами R1-R5 из различных частей *R. platyacantha*; КА-койевая кислота, значения на графиках представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение ($n=3$), *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$

2.5 Антимеланомная активность экстрактов *R. platyacantha* in vitro

Несколько фенольных соединений, идентифицированных в экстракте *R. platyacantha*, включая эллаговую и галловую кислоты [60, 61], кемпферол [62] и кверцетин [63], вызывают апоптоз в клеточных линиях меланомы in vitro. Следовательно, экстракты, богатые этими соединениями, могут использоваться для химиопрофилактики меланомы, подавляя инициацию, продвижение и прогрессирование раковых клеток. Добавление химиопрофилактических средств в косметику может повысить их эффективность за счет многократного нанесения непосредственно на поверхность кожи [64].

Экстракты R1-R5 анализировали на их цитотоксичность *in vitro* в отношении клеточных линий меланомы человека (A375, SH-4) и мыши (B16-F10) и нераковых кератиноцитов человека HaCaT (таблица 3). За исключением экстракта R1, все проанализированные экстракты были цитотоксичны для клеточных линий меланомы. Наиболее выраженная цитотоксичность экстрактов R3 и R5 наблюдалась в отношении клеточной линии A375 (IC₅₀ = 97,31 и 72,90 мкг/мл соответственно). Цитотоксический эффект этих экстрактов в отношении нераковых клеток HaCaT был ниже в 1,9-2,4 раза (IC₅₀ = 187,30 и 174,20 мкг/мл соответственно). Насколько нам известно, это первый отчет, показывающий антимеланомную активность экстрактов *Rosa* spp. Ранее было доказано, что экстракты *R. canina* цитотоксичны для линий клеток толстой кишки, шейки матки, гепатоцеллюлярной и немелкоклеточной карциномы легкого и лейкемии [65, 66]. *R. rugosa* уменьшала пролиферацию клеток рака предстательной железы [67]. Было показано, что *R. roxburghii* индуцирует внутренний апоптоз в клеточных линиях плоскоклеточной карциномы пищевода, карциномы желудка и карциномы легких [68].

Таблица 3. Цитотоксичность экстрактов R1-R5 из различных частей *R. platyacantha* (IC₅₀ в мкг/мл)

	R1	R2	R3	R4	R5
HaCaT	>500	180,60	241,40	304,30	293,90
A365	>500	120,40	97,31	199,50	72,90
SH4	>500	149,70	169,00	129,90	142,00
B16F10	>500	226,10	187,30	136,80	174,20

2.6. Фракционирование экстракта R3 и хроматографический анализ фракций

Среди сравниваемых биологических активностей экстракт R3 характеризовался наиболее выраженными антиоксидантными и антимеланомными свойствами, а также исключительной способностью ингибировать как моно-, так и дифенолазную активность тирозиназы. По этой причине экстракт R3 был разделен на девять фракций (A-I), чтобы идентифицировать активные соединения, ответственные за наблюдаемую антиоксидантную, антимеланомную и ингибирующую активность в отношении тирозиназы. Фракции А и Б были исключены из дальнейшего анализа, так как содержали следовые количества органических соединений и не растворялись в ДМСО. Фракции С-I сначала анализировали на их фитохимический состав. Результаты представлены в таблице 4. Хроматограммы доступны в дополнительных материалах (рис. S2). Наиболее распространенными соединениями во всех фракциях были галловая кислота и ее производные. Фракции Е-I также содержали производные кверцетина и бревифолина, тогда как во фракциях С и D эти соединения отсутствовали.

Таблица 4. Сравнение химического состава фракций КИ, полученных из экстракта R3 после анализа ВЭЖХ/ЭСИ-квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии в режиме отрицательных ионов

Нет	Время удерживания	Имя	Формула	С	Д	Е	Ф	грамм	ЧАС	я
1	1.920	Хинная кислота	C ₇ H ₁₂ O ₆	-	-	-	-	+	+	+
2	2.507	Лимонная кислота	C ₆ H ₈ O ₇	-	-	-	-	-	-	-
3	2,955	Изомер глюкозида галловой кислоты	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	-	-	-	+	+	-	-
4	3.396	Гомоизолимонная кислота	C ₇ H ₁₀ O ₇	-	-	-	-	+	-	-
5	4.092	Галловая кислота	C ₇ H ₆ O ₅	-	+	+	+	+	+	+
6	4.530	Теогаллин	C ₁₄ H ₁₆ O	-	-	-	-	+	+	+

			10						
7	6.495	Изомер глюкозида галловой кислоты	$C_{13}H_{16}O_{10}$	-	-	+	+	-	-
8	7.826	производное галловой кислоты	$C_{23}H_{19}O_{18}$	-	-	-	+	-	-
9	9.877	Изомер глюкозида метоксигалловой кислоты	$C_{14}H_{18}O_{10}$	-	-	-	+	-	-
10	10.127	Хлорогеновая кислота	$C_{16}H_{18}O_9$	-	-	-	+	-	-
11	11.639	Изомер метоксигалловой кислоты	$C_8H_{10}O_6$	+	+	+	-	+	+
12	13.378	Производное эллаговой кислоты	$C_{34}H_{26}O_{22}$	-	-	+	+	-	-
13	16.619	Производное эллагитанина	$C_{30}H_{24}O_{25}$	-	-	+	-	-	-
14	17.214	Производное эллагитаннина	$C_{34}H_{26}O_{22}$	-	-	-	+	-	+
15	17.255	Криптохлорогенный	$C_{16}H_{18}O_9$	-	-	-	-	-	-
16	17.559	Стриктинин	$C_{27}H_{22}O_{18}$	-	-	-	+	-	-
17	19.218	Бревифолин карбоновая кислота	$C_{13}H_8O_8$	-	-	-	+	+	+
18	20.860	Бревифолина карбоксилат	$C_{12}H_7O_6$	-	-	+	-	+	+
19	21.130	Метилбревифолинкарбоксилат	$C_{14}H_{10}O_8$	-	-	+	+	+	+
20	23.021	Изомер галлиоглюкозида кверцетина	$C_{28}H_{24}O_{16}$	-	-	+	-	-	-
21	23.281	Изомер галлиоглюкозида кверцетина	$C_{28}H_{24}O_{16}$	-	-	+	-	-	-
22	23.951	Глюкозид эллаговой кислоты	$C_{20}H_{16}O_{13}$	-	-	-	-	-	-
23	23.997	Кверцетин 3-О глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{12}$	-	-	+	+	+	+
24	24.351	Эллаговая кислота	$C_{14}H_6O_8$	-	-	-	-	-	-
25	25.490	Кверцетин глюкуронид	$C_{21}H_{18}O_{13}$	-	-	-	+	+	+
26	26.172	Дигаллиоилглюкозид	$C_{22}H_{12}O_{13}$	-	-	+	-	-	-
27	26.326	Кверцетин 7-О-глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{12}$	-	-	-	-	-	-
28	28.380	Изомер галлиоглюкозида кверцетина	$C_{28}H_{24}O_{16}$	-	-	+	+	+	-
29	29.197	Рутин	$C_{27}H_{30}O_{16}$	-	-	+	+	-	-
30	31.014	Кемпферол рутинозид	$C_{27}H_{30}O_{15}$	-	-	+	+	-	-
31	34.432	кемпферол	$C_{15}H_{10}O_6$	-	-	-	-	-	-

2.7 Антиоксидантная и антимеланомная активность фракций СI, выделенных из экстракта R3

Антирадикальный потенциал фракций СI сравнивали с использованием анализов очистки DPPH и ABTS, показывая, что наиболее активные антирадикальные соединения присутствовали во фракции E. Фракция С была наименее активной (таблица 5).

Таблица 5. Активность по удалению DPPH и ABTS фракций СI экстракта цветочных почек (R3) *R. platyacantha* (IC₅₀, мкг/мл ± стандартное отклонение); каждое значение представляет собой среднее значение ± стандартное отклонение (n = 3)

	С	Д	Е	Ф	грамм	ЧАС	я
Удаление DPPH	11,99 ± 0,96	2,60 ± 0,10	2,17 ± 0,04	6,86 ± 0,50	3,87 ± 0,26	5,89 ± 0,60	5,14 ± 0,57
ABTS очистка	2510,00 ± 449,81	4,77 ± 0,10	4,30 ± 0,55	13,87 ± 0,05	8,52 ± 0,27	11,14 ± 0,91	10,39 ± 0,19

Сравнение цитотоксичности *in vitro* фракций СI в отношении кератиноцитов HaCaT и клеток меланомы A375 показало, что соединения, присутствующие во фракциях FI, не являются цитотоксичными для обеих тестируемых клеточных линий. Наиболее выраженный цитотоксический эффект в отношении клеток меланомы был обнаружен у фракции D (IC₅₀ = 70,30 мкг/мл). Эта фракция также оказалась наиболее цитотоксичной для нераковых клеток HaCaT, но расчетное значение IC₅₀ (137,60 мкг/мл) было примерно в 2 раза выше, чем для клеток меланомы A375 (табл. 6). Два соединения, идентифицированные во фракции D, представляют собой изомер галловой кислоты и метоксигалловой кислоты. Сравнительное содержание галловой кислоты было самым высоким среди всех анализируемых фракций. Ранее было показано, что галловая кислота индуцирует апоптоз в клетках меланомы A375.S2 посредством активации проапоптотических белков, таких как Bax, подавления антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, и способствует активации каспазы-9 и каспазы-3 [61].

Таблица 6. Цитотоксичность фракций КИ экстракта закрытых цветков (R3) *R. platyacantha* (IC₅₀, мкг/мл)

	С	Д	Е	Ф	грамм	ЧАС	я
HaCaT	251,50	137,60	190,70	>500	>500	>500	>500
A375	170,60	70,30	205,80	>500	>500	>500	>500

2.8 Идентификация ингибиторов тирозиназы из фракций E и F, выделенных из экстракта R3

В исследованиях ингибирования тирозиназы фракции E и F показали наиболее значительное ингибирование активности монофенолазы и дифенолазы. Фракция E снижала монофенолазную активность тирозиназы более чем на 90% и была более эффективной, чем койевая кислота в соответствующих концентрациях (рис. 4).

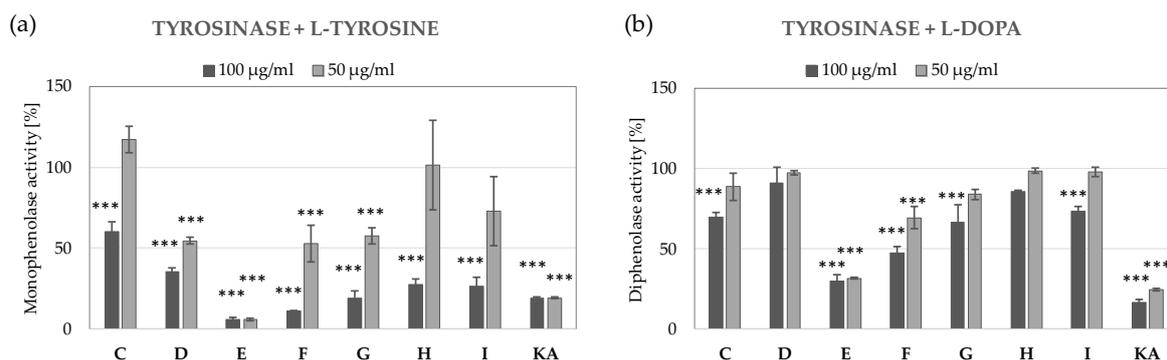
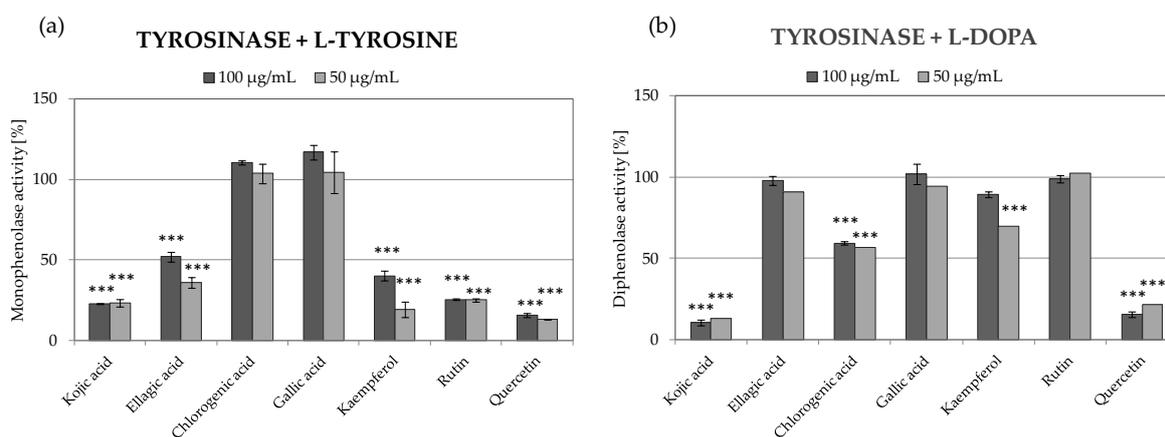


Рисунок 4. Ингибирование монофенолазной (а) и дифенолазной (б) активности тирозиназы фракциями КИ экстракта закрытых цветков (R3) *R. platyacantha* КА- койевая кислота, значения на графиках представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение ($n=3$), *** $p<0,001$

351
352
353
354
355
356

Хроматографический анализ показал, что фракция E, характеризующаяся наибольшей тирозиназоингибирующей активностью, содержит преимущественно галловую кислоту и ее производные. Содержание этих соединений во второй наиболее активной фракции F было значительно ниже, что свидетельствует о том, что галловая кислота и ее производные не ответственны за наблюдаемые тирозиназоингибирующие свойства. Другие соединения, присутствующие во фракциях E и F, включают производные кемпферола, кверцетина и рутина. Чтобы идентифицировать соединение, ответственное за ингибирующий потенциал тирозиназы фракций E и F и экстракта R3, в том же анализе анализировали чистые эталонные соединения. Как показано на фиг.5, кверцетин, рутин, кемпферол и эллаговая кислота были наиболее эффективными ингибиторами монофенолазной активности тирозиназы, что было сопоставимо с широко используемым ингибитором тирозиназы — койевой кислотой.. Дифенолазная активность тирозиназы снижалась под действием кверцетина (78% ингибирования при 50 и кемпферола (30% ингибирования при 50 мкг/мл). На моно- и дифенолазную активность тирозиназы галловая кислота не влияла. На основании полученных данных можно сделать вывод, что кверцетин, кемпферол, рутин и их производные ответственны за ингибирующие тирозиназу свойства экстракта цветочных почек *R. platyacantha*. Кверцетин уже был описан на модели мышинной меланомы B16 в качестве эффективного ингибитора тирозиназы из *R. canina* . Ингибирование меланогенеза кверцетином было связано с ингибированием как активности тирозиназы, так и экспрессии белка [50].

357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378



379

Рисунок 5. Ингибирование монофенолазной (а) и дифенолазной (б) активности тирозиназы основными компонентами, идентифицированными во фракции Е из экстракта R3, значения на графиках представляют собой среднее \pm стандартное отклонение ($n=3$), *** $p<0,001$

3. Материалы и методы

3.1. Химикаты и реагенты

Линии клеток злокачественной меланомы человека A375 (ATCC CRL-1619), меланомы человека SH-4 (ATCC CRL-7724) и меланомы мыши B16-F10 (ATCC CRL-6475) были приобретены у LGC Standards (Ломянки, Польша). Иммутизированные кератиноциты человека HaCaT были приобретены у CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Германия). Фетальную бычью сыворотку (FBS) получали от Pan-Biotech (Aidenbach, Германия). Модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM)/высокая глюкоза, с феноловым красным и без него, фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS), грибная тирозиназа *Agaricus bisporus*, L-тирозин, 3,4-дигидрокси-1-фенилаланин (L-DOPA), 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH), диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина (H_2 DCFDA), N-ацетилцистеин (NAC), N-сукцинил-Ala-Ala-Ala-p-нитроанилид (SANA), койевая кислота ($\geq 99,0\%$), хлорогеновая кислота ($\geq 95\%$), эллаговая кислота ($\geq 95\%$), галловая кислота (97,5-102,5%), кемпферол ($\geq 97,0\%$), кверцетин ($\geq 95,0\%$), рутин ($\geq 94,0\%$) и нейтральный красный раствор (3,3 г/л) были приобретены у Merck (Дармштадт, Германия). Воду (H_2O), муравьиную кислоту ($HCOOH$) и ацетонитрил (CH_3CN) для ВЭЖХ-анализа приобретали у JT Baker (Witko, Лодзь, Польша).

3.2. Растительный материал

Растение *Rosa platyacantha* Schrenk было собрано 23 мая 2019 года в горах Заилийского Алатау горного района Северного Тянь-Шаня (Алматы, Казахстан). Идентификация растения произведена Институтом ботаники и фитоинтродукции, расположенным в г. Алматы, Казахстан. Собранный растительный материал сушили при комнатной температуре при относительной влажности $50 \pm 5\%$ в проветриваемом помещении в течение 5 суток. Паспортный образец растения хранится в г. Алматы, в Институте ботаники и фитоинтродукции Комитета науки МОН РК.

3.3. Процедура экстракции и фракционирование

Для целей данного исследования пять экстрактов из различных частей *R. platyacantha* были приготовлены, как описано в таблице 7.

Таблица 7. Экстракты, приготовленные из различных частей *Роза платьяканта* Шренк

Извлечь символ	R1	R2	R3	R4	R5
Часть <i>R. platyacantha</i>	Цветы	Листья	Закрытые цветы (бутоны)	Листья со стеблями	Цветы без лепестков

30 г высушенного растительного сырья смешивали с 400 мл 70% метанола и помещали на 30 мин в ультразвуковую ванну (Bandelin SONOREX Digital 10P) при t 30°C. Затем экстракт фильтровали и добавляли свежую порцию растворителя (300 мл). После 30-минутной ультразвуковой экстракции растительный материал оставляли для мацерации на ночь, затем экстракт фильтровали, добавляли новую порцию растворителя и проводили ультразвуковую экстракцию. Собирали фильтраты с каждой стадии экстракции и удаляли растворитель с помощью роторного испарителя при пониженном давлении.

5 мг экстракта, полученного из *R. platyacantha* с закрытыми цветками (R3) абсорбировали на небольшой порции силикагеля (230-400 меш). Для фракционирования этого экстракта использовали сухую колоночную вакуумную хроматографию (DCVC). Адсорбированный экстракт загружали в сухую колонку с силикагелем (230-400 меш) и элюировали 200 мл смеси н-гексан-EtOAc (7:3, об/об), н-гексан-EtOAc (1:1, об/об), н-гексан-EtOAc (3:7, об/об), EtOAc, EtOAc-MeOH (7:3, об/об), EtOAc-MeOH (1:1, об/об), EtOAc-MeOH (3:7, об/об), MeOH и MeOH-вода (9:1, об/об) последовательно. Собранные фракции контролировали с помощью ТСХ с использованием н-гексан-EtOAc (1:1, об/об) и EtOAc-MeOH (1:1, об/об) в качестве подвижных фаз. Эта процедура дает 9 фракций (AI).

3.4. Общее содержание фенолов и флавоноидов

Содержание общих фенольных соединений определяли, как описано Fukumoto и Mazza [69], с небольшими изменениями. 150 мкл экстрактов (1 мг/мл) смешивали с 750 мкл реагента Фолина-Чокальтеу (1:10 по объему, в воде) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Образцы смешивали с 600 мкл 7,5% (масс. об.) Na_2CO_3 и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) в темноте. Поглощение измеряли при $\lambda = 740$ нм с использованием спектрофотометра DR 600 (Hach Lange, Вроцлав, Польша). Калибровочную кривую ($y = 0,4046x - 0,429$; $R^2 = 0,9978$) строили с использованием 0–100 мкг/мл галловой кислоты. Содержание общих фенолов рассчитывали в эквивалентах галловой кислоты (ЭАК) в мг на 1 г массы высушенного экстракта (св).

Содержание флавоноидов анализировали по методу, описанному Matejic et al. [70] с некоторыми изменениями. 150 мкл анализируемых экстрактов (1 мг/мл) смешивали с 650 мкл реакционной смеси (61,5 мл 80% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ + 1,5 мл 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ + 1,5 мл 1 М CH_3COOH ГОТОВИТЬ ПИЩУ). После 40-минутной инкубации при комнатной температуре в темноте измеряли оптическую плотность образцов при $\lambda = 415$ нм. Калибровочную кривую ($y = 0,313x - 0,3127$, $R^2 = 0,9988$) строили с использованием 0–100 мкг/мл кверцетина. Содержание флавоноидов выражается в эквивалентах кверцетина (QuE) на грамм веса высушенного экстракта (dw).

3.5. Хроматофический анализ

Очищенные образцы были качественно проанализированы с помощью системы ВЭЖХ/ESI-QTOF-MS в режиме отрицательных ионов с использованием масс-спектрометра 6530B Accurate-mass-TOF-MS (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, Калифорния, США) с ESI- Ионный источник Jet Stream. Хроматограф Agilent 1260 был оборудован детектором DAD, автоматическим пробоотборником, бинарным градиентным насосом и термостатом для колонок. В качестве неподвижной фазы использовалась колонка Gemini® 3 мкм NX-C18 110 Å, колонка LC 100×2 мм. Градиент растворителей: в качестве подвижных фаз использовали воду с 0,1% муравьиной кислотой (растворитель А) и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислотой (растворитель Б). Была принята следующая процедура градиента: 0–45 мин, 0–60% В; 45–46 мин, 60–90% В; 46–50 мин 90% (Б), время постинга 10 мин. Общее время анализа составило 60 мин при стабильной скорости потока 0,200 мл/мин. Объем инъекции для экстрактов составлял 10 мкл. Анализ ESI-QTOF-MS выполняли в соответствии со следующими параметрами источника ионов: ESI с двойной струйной струей, режим положительных и отрицательных ионов, скорость потока газа (N_2): 12 л/мин, давление в распылителе: 35 фунтов на кв. дюйм, испаритель темп.: 300 °C; диапазон m/z 100–1000 единиц массы, с режимом регистрации Авто MS/MS, диссоциация, индуцированная столкновением (CID): 10 и 40 В со скоростью сканирования MS 1 спектр в секунду, 2 спектра за цикл, скиммер: 65 В, фрагментатор: 140 В и октополь RF Пик: 750 В. Идентификацию

соединений проводили по базе данных Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) и сравнивали с литературными данными.

3.6. Анализ удаления радикалов DPPH

Антирадикальная активность *P. platyacantha* экстракты и фракции были получены с использованием анализа удаления радикалов DPPH в соответствии с модифицированным протоколом, описанным Matejic et al. [70]. 100 мкл экстрактов или фракций (0,0005–1 мг/мл) смешивали со 100 мкл рабочего раствора DPPH (25 мМ в 99,9% метаноле; $A_{540} \approx 1$). В качестве контрольной пробы использовали 100 мкл растворителя (метанола), смешанного со 100 мкл DPPH. После 20 мин инкубации при комнатной температуре в темноте оптическую плотность образцов измеряли при $\lambda = 540$ нм с помощью устройства для чтения микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США). Полученные значения измерений были скорректированы значениями оптической плотности образцов без DPPH. Процент поглощения радикалов DPPH рассчитывали на основе следующего уравнения:

$$\% \text{ удаления DPPH} = [1 - (\text{Abs(S)}/\text{Abs(C)})] \times 100\% \quad (1)$$

где: Abs(S) - скорректированная абсорбция образца, Abs(C) - скорректированная абсорбция контрольного образца.

Полученные результаты использовали для расчета значений IC_{50} , определяемых как концентрация высушенного экстракта/фракции, необходимая для удаления 50% активности радикалов DPPH.

3.7. Анализ удаления радикалов ABTS

Антиоксидантная активность *P. platyacantha* сравнивали с использованием анализа удаления радикалов ABTS [71] с модификациями. Рабочий раствор ABTS готовили путем растворения 7 мМ ABTS в 2,45 мМ $K_2S_2O_8$ в дистиллированной воде ($A_{405} \approx 1$). 15 мкл экстрактов, разведенных в ДМСО в диапазоне концентраций 0,0005 – 1 мг/мл, смешивали со 135 мкл рабочего раствора ABTS. 15 мкл ДМСО, смешанный со 135 мкл ABTS, служил контрольным образцом. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре в темноте измеряли оптическую плотность образцов при $\lambda = 405$ нм с помощью микропланшет-ридера (FilterMax F5 Molecular Devices, США). Полученные значения были скорректированы на величину поглощения образца без ABTS. Процент нейтрализации радикалов ABTS рассчитывали на основе следующего уравнения:

$$\% \text{ поглощения ABTS} = [1 - (\text{Abs(S)}/\text{Abs(C)})] \times 100 \quad (2)$$

здесь: Abs(S) - скорректированная абсорбция экстракта, Abs(C) - скорректированная абсорбция контрольного образца (ABTS + растворитель).

Значение IC_{50} определяли как концентрацию высушенного экстракта в мкг/мл, необходимую для удаления 50% активности радикалов ABTS.

3.8 Анализ ингибиторов тирозиназы

Ингибирование монофенолазной и дифенолазной активности тирозиназы грибов экстрактами и фракциями *R. platyacantha* анализировали, как ранее описано Wang и др. и Uchida и др. соответственно [72, 73]. Для ингибирования монофенолазы 80 мкл фосфатного буфера (100 мМ, pH = 6,8) смешивали с 20 мкл анализируемого образца или койевой кислоты в качестве ингибирующего

контроля (конечные концентрации: 100 мкг /мл, 50 мкг /мл и 25 мкг /мл). Добавляли 20 мкл рабочего раствора тирозиназы грибов (500 ЕД/мл) на образец с последующей предварительной инкубацией в течение 10 минут при комнатной температуре. После добавления 80 мкл 2 мМ L-тирозина образцы инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте.

Анализ ингибирования дифенолазы проводили путем смешивания 120 мкл фосфатного буфера (100 мМ, рН 6,8) с 20 мкл разведенных образцов или койевой кислоты в качестве ингибирующего контроля (конечные концентрации: 100 мкг /мл, 50 мкг /мл и 25 мкг /мл) и 20 мкл раствора тирозиназы грибов (500 ЕД/мл). Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. После добавления 40 мкл 4 мМ L-DOPA образцы инкубировали еще 20 мин при комнатной температуре в темноте.

В обоих анализах образование дофахрома в присутствии или в отсутствии анализируемых образцов измеряли спектрофотометрически при $\lambda = 450$ нм с использованием устройства для чтения микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США). Значения корректировали по абсорбции экстрактов без тирозиназы, L-тирозина и L-ДОФА. Контрольный образец (100% тирозиназная активность) содержал фосфатный буфер, тирозиназу, равный объем растворителя и соответствующую дозу каждого субстрата. Активность тирозиназы рассчитывали по уравнению:

$$\% \text{ активности тирозиназы} = [\text{Abs(S)} / \text{Abs(C)}] \times 100\% \quad (3)$$

где: Abs(S) - поглощение образца (экстракт + тирозиназа + субстрат), Abs(C) - поглощение контрольного образца (растворитель + тирозиназа + субстрат).

3.9. Ингибиторный анализ эластазы

Ингибирование эластазы экстрактами *R. platyacantha* было установлено с использованием протокола, описанного Horng и соавт. [74]. 100 мкл Tris-HCl (0,2 М, рН 6,8), содержащего 0,15 М NaCl и 0,01 М CaCl₂, смешивали с 15 мкл образца (100 мкг /мл и 50 мкг /мл) или ДМСО (контроль растворителя) и 25 мкл рабочего раствора эластазы (50 мкг/мл, 2 ЕД/мл, в 0,1 Трис-НCl, рН 6,8). После 10-минутной инкубации при комнатной температуре к каждому образцу добавляли по 20 мкл 2,9 мМ SANA, перемешивали и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Поглощение образцов при $\lambda = 405$ нм измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США). Полученные значения были скорректированы на оптическую плотность разбавленных экстрактов без эластазы и SANA. Активность эластазы рассчитывали по уравнению:

$$\% \text{ активности эластазы} = [\text{Abs(S)} / \text{Abs(C)}] \times 100\% \quad (4)$$

где: Abs(S) - оптическая плотность образца (экстракт + эластаза + SANA), Abs(C) - оптическая плотность контрольного образца (растворитель + эластаза + SANA).

3.10. Ингибиторный анализ коллагеназы

Потенциал ингибирования коллагеназы экстрактов, полученных из различных частей *R. platyacantha* в концентрации 100 мкг /мл и 50 мкг /мл, анализировали с помощью колориметрического теста активности коллагеназы (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Здесь в качестве ингибирующего контроля использовали 0,01 М 1,10-фенантролина. Анализ и расчет активности коллагеназы (ЕД/мл) проводили в соответствии с инструкциями производителя. Затем полученные значения использовали для расчета активности коллагеназы по

сравнению с контрольным образцом (100% активность коллагеназы) по следующему уравнению:

$$\% \text{ активности коллагеназы} = [\text{Act(S)} / \text{Act(C)}] \times 100\% \quad (5)$$

где: Act(S) - коллагеназная активность анализируемого образца, Act(C) - коллагеназная активность контрольного образца.

3.11. Анализ цитотоксичности *in vitro*

Цитотоксичность экстрактов и фракций *R. platyacantha* исследовали с помощью теста поглощения нейтрального красного [75]. Линии клеток меланомы человека А375, SH-4, меланомы мыши В16-F10 и кератиноцитов человека HaCaT поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% FBS при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для экспериментальных целей 3 × 10³ клеток высевали на лунку 96-луночного планшета и выращивали в течение ночи. Затем клетки обрабатывали различными концентрациями экстрактов *R. platyacantha* (12,5–400 мкг/мл) или равным объемом ДМСО в качестве контроля растворителя. После 48 ч культивирования клетки инкубировали в течение 3 ч с 33 мкг/мл раствора нейтрального красного в среде DMEM, содержащей 1% FBS, промывали DPBS и лизировали, используя подкисленный раствор этанола (50% об./об. этанола, 1% об./об. уксусной кислоты). Поглощение высвобожденного нейтрального красного измеряли при λ = 540 нм с помощью считывателя микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США) и корректировали по поглощению при λ = 620 нм. Среднее измеренное значение для лизата из контрольных клеток принимали за 100% клеточную жизнеспособность и использовали для расчета процента жизнеспособных клеток после обработки экстрактом. Полученные значения использовали для расчета IC₅₀, определяемой как концентрация высушенного экстракта/фракции, снижающая жизнеспособность каждой клеточной линии на 50%.

3.12. Обнаружение внутриклеточных АФК с помощью H₂DCFDA

Влияние экстрактов *R. platyacantha* R1-R5 на внутриклеточные уровни АФК в обработанных H₂O₂ кератиноцитах HaCaT измеряли с использованием анализа 2',7'-дихлорфлуоресцина диацетата (H₂DCFDA), описанного Wu и Yotnda [76] с некоторыми модификациями. Сперва 1 × 10⁴ HaCaT кератиноциты высевали на 96-луночные планшеты с черными стенками и культивировали в течение ночи в среде DMEM с добавлением 10% FBS. Клетки нагружали 5 мкМ H₂DCFDA, разведенным в бессывороточной и не содержащей фенолового красного DMEM при 37°C и 5% CO₂ в течение 30 мин в темноте. Разбавленные экстракты R1-R5 (конечные концентрации 25 мкг/мл и 10 мкг/мл) или известный поглотитель АФК N-ацетил-L-цистеин (NAC, 2 мМ) предварительно смешивали в бессывороточной и не содержащей фенолового красного DMEM с 1 мМ H₂O₂ и применяли к клеткам, нагруженным H₂DCFDA. На контрольные клетки наносили равный объем DMEM, не содержащей сыворотки и фенолового красного. Затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в темноте. Интенсивность флуоресценции образующегося 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) измеряли через 60 минут инкубации с использованием ридера микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США) при максимальном спектре возбуждения и эмиссии 485 и 535 нм, соответственно. Полученные значения корректировали по флуоресценции соответственно разбавленных экстрактов R1-R5, NAC или бессывороточной, не содержащей фенолового красного DMEM (фоновая флуоресценция).

3.13. Статистический анализ

Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

4. Выводы

Исследование является первой комплексной характеристикой химического профиля и отдельных биологических свойств экстрактов, полученных из различных частей *R. platyacantha*, произрастающего в Алматинской области Казахстана. Фитохимические исследования подтверждают наличие галловой и эллаговой кислот и их производных как наиболее характерных компонентов этого вида *Rosa*. Впервые подтверждено наличие производных бревифолина у рода *Rosa*, а наличие флавоноидов у исследованных *R. platyacantha*.

Представленные результаты также показывают, что экстракт, полученный из закрытых цветков (бутонов) (R3) *R. platyacantha*, является богатейшим источником фитосоединений со значительным антиоксидантным потенциалом, подтвержденным стандартными анализами удаления радикалов DPPH и ABTS, а также исследованиями *in vitro* на кератиноцитах HaCaT. Экстракт R3 также был эффективен против клеток меланомы человека, проявляя значительно более низкую цитотоксичность в отношении нераковых клеток кожи. Кроме того, экстракт закрытых цветков эффективно ингибирует монофенолазную и дифенолазную активность тирозиназы, что свидетельствует о его значительном осветляющем потенциале кожи. Активные соединения экстрактов, которые могут быть ответственны за наблюдаемую активность, включают, в частности, кверцетин и его производные, например рутин. Галловая и эллаговая кислоты и кемпферол также являются активными ингредиентами.

Основываясь на профиле биологической активности, экстракт цветочных почек *R. platyacantha* следует рассматривать как эффективный активный ингредиент осветляющих кожу, омолаживающих и защищающих косметических средств. Необходимо провести дальнейшие исследования с использованием клеточных линий кожи человека и трехмерных моделей тканей, чтобы получить дополнительные данные о безопасности и косметической эффективности экстрактов *R. platyacantha*.