

На правах рукописи

ЮГАЙ
ЮЛИЯ АНАТОЛИЕВНА



**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ**

1.5.6 — Биотехнология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток 2021

Работа выполнена в лаборатории бионанотехнологий и биомедицины ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент,

Шкрыль Юрий Николаевич

Официальные оппоненты:

Кусайкин Михаил Игоревич

доктор биологических наук, доцент ФГБУН

«Тихоокеанский институт биоорганической

химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН,

в.н.с. лаборатории химии ферментов

Шевцов Максим Алексеевич

кандидат биологических наук, ФГБУН

«Институт цитологии» РАН, в.н.с.

лаборатории защитных механизмов клетки

Ведущая организация: Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, г. Уфа.

Защита состоится «18» февраля 2022 г. в «14» часов на заседании диссертационного совета 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159. Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «__» декабря 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Тюнин А. П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Наночастицы (НЧ) металлов благодаря своим уникальным оптическим, каталитическим, электрическим и биологическим свойствам обладают огромным потенциалом для применения в различных отраслях промышленности (Ferdous and Nemmar, 2020; Pardhi et al, 2020). При этом существующие физические и химические способы получения НЧ не всегда отвечают требованиям эффективности, рентабельности и безопасности, предъявляемым к данным технологиям. Разработка альтернативных биологических и биохимических методов синтеза НЧ является актуальной задачей бионанотехнологии.

Получение новых наноматериалов с использованием биологических систем или процессов, представляет большой фундаментальный и практический интерес. Синтез НЧ металлов является стремительно развивающимся направлением в этой области (Ferdous and Nemmar, 2020). Наряду с физическими и химическими методами получения НЧ металлов, в последние годы большое внимание исследователей привлекают биотехнологические подходы. В качестве биологических объектов, используемых для синтеза НЧ металлов, наиболее широко используются микроорганизмы и растения, а также модифицированные и не модифицированные экстракты этих организмов.

Бактерии и грибы являются удобной системой для получения НЧ, поскольку методы культивирования многих видов отработаны в промышленном масштабе и не требуют больших затрат (Ferdous and Nemmar, 2020). При этом формирование НЧ может происходить как внутриклеточно, так внеклеточно. Однако использование микробиологического синтеза ограничено недостаточно высокой продуктивностью процесса, что, вероятно, связано с токсичным действием НЧ на клетки микроорганизмов, а также с потенциальной опасностью некоторых штаммов для человека, что, в свою очередь, ограничивает сферу применения НЧ.

Оказалось, что растения, также как и микроорганизмы, способны образовывать НЧ как внутри, так и вне клеток (Gopinath and Velusamy, 2013). Высокое содержание различных биоактивных компонентов, включая белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и вторичные метаболиты, которые могут участвовать в формировании и стабилизации НЧ металлов, делает растения перспективным инструментом для их биотехнологического получения.

Степень разработанности темы. К настоящему времени, более 100 видов растений были изучены на предмет их способности формировать НЧ металлов (Sengul and Asmatulu, 2020). Частицы имели чаще треугольную, гексагональную и декаэдрическую формы, иногда образовывали стержни или были полидисперсными (Raj and Khan, 2016). Размеры варьировали, от единиц до сотен нанометров. Какой-либо закономерности в этом процессе пока выявить не удалось из-за непостоянства химического состава растений, связанного с почвенными, климатическими и сезонными условиями культивирования. Понимание механизмов формирования частиц позволит влиять на их морфологические характеристики, включая размер и форму. В то же время применение клеточных культур растений для формирования НЧ металлов остается малоисследованной областью. Кроме того, изучение процесса формирования НЧ металлов в культивируемых клетках растений имеет ряд преимуществ, поскольку культура клеток является более простой системой по сравнению с целым растением, а параметры культивирования легко поддаются регулированию. В то же время, стандартные биотехнологические подходы, а также методы генетической инженерии позволяют проводить модификацию биосинтетических путей первичного и вторичного метаболизма быстрее, чем при работе с целым растением. В связи с вышесказанным, исследование восстановительного потенциала клеточных культур растений, их экстрактов и отдельных фракций представляет значительный теоретический и практический интерес.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование восстановительного потенциала растительных клеточных культур для получения

наночастиц серебра и золота, а также изучение их свойств и возможности применения в медицине и биотехнологии.

Для реализации поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Изучить восстановительную способность экстрактов клеточных культур растений, определить влияние условий реакции и вклад отдельных компонентов экстракта на процесс формирования металлических наночастиц.
2. Изучить восстановительную активность очищенных полисахаридов различной структуры на биосинтез и свойства наночастиц серебра.
3. Определить влияние генной модификации на восстановительные свойства трансгенных клеточных культур и растений.
4. Провести сравнительный анализ биологической активности наночастиц, полученных с использованием клеточных культур растений.

Научная новизна. В данной работе впервые изучен восстановительный потенциал клеточных культур модельных растений, табака обыкновенного *Nicotiana tabacum* резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana*, а также лекарственных растений, марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, женьшеня настоящего *Panax ginseng*, винограда культурного *Vitis vinifera* и воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon*. Определено влияние различных факторов на эффективность продукции НЧ. Установлен вклад отдельных фракций экстракта в биосинтез НЧ серебра (Ag-НЧ). Было показано, что полисахариды, низкомолекулярные полифенольные соединения, белки и, в меньшей степени, нуклеиновые кислоты, проявляют синергетический восстановительный потенциал во время биологического синтеза металлических НЧ. Впервые был продемонстрирован альтернативный экологически безопасный синтез монодисперсных Ag-НЧ с использованием трех типов полисахаридов (альгинат, фукоидан, ламинаран) морских водорослей *Saccharina cicharioides* и *Fucus evanescens*. Наши данные подтвердили предположение, что полисахариды способны выступать в качестве восстановительных и стабилизирующих молекул. Также в данной работе впервые осуществлен синтез биметаллических НЧ серебро/золото (Ag/Au-НЧ) с помощью клеточной культуры воробейника.

Впервые для биоинженерии восстановительного потенциала клеток растений были использованы методы генетической инженерии растений. Экспериментально установлено, что гетерологичная экспрессия генов, влияющих на первичный и вторичный метаболизм клеток, приводит к повышению их восстановительного потенциала, что положительно влияет на общую продукцию металлических НЧ.

В ходе выполнения данной работы было изучено цитотоксическое действие биогенных НЧ в отношении глиомы С6 крысы, нейробластомы N2A и эмбриональных фибробластов 3Т3 мыши *in vitro*, а также их влияние на скорость миграции фибробластов.

Была обнаружена способность Ag-НЧ активировать биосинтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений, тем самым выступая в качестве элиситоров продукции ценных биологически активных веществ. Выявлены фунгицидные свойства биогенных Ag-НЧ в отношении нескольких возбудителей фузариоза пшеницы, включая *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* и *F. sporotrichioides*.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе работы данные представляют значительный интерес с точки зрения расширения знаний об особенностях формирования биогенных НЧ металлов с участием экстрактов клеточных культур растений и их отдельных компонентов. Выявление активных биомолекул экстракта позволит в дальнейшем более направленно проводить скрининг их продуцентов как наиболее перспективных биологических систем для продукции НЧ. Применение методов генной инженерии для активации вторичного метаболизма или гетерологичной экспрессии каталитически-активных макромолекул заложило основу для развития нового направления в области биоинженерии восстановительного потенциала клеток растений в отношении биологического способа получения НЧ. С точки зрения практического использования, полученные результаты имеют высокий потенциал для использования в области технологии

получения биогенных НЧ металлов и их применения в биомедицине, сельском хозяйстве и биотехнологии. Стоит отметить, что наличие высоко- и низкомолекулярных биологических соединений, адсорбированных на поверхности образованных биогенных НЧ, в области т.н. «короны» обеспечивает им уникальную биологическую активность. Для полученных в рамках проекта частиц была продемонстрирована цитотоксическая, антибактериальная, элиситорная и фунгицидная активности. Высокая фунгицидная активность была подтверждена при обеззараживании семян пшеницы Российской селекции. Преимуществом биологического подхода является возможность использования для синтеза НЧ побочных продуктов биотехнологического производства, например, клеточного дебриса после экстракции целевого продукта, отдельных примесных фракций, образующихся при технологическом процессе или компонентов отработанных питательных сред.

Методология и методы исследования. Теоретической основой исследования послужили современные научные труды отечественных и зарубежных авторов, посвященные поиску биологических, экологически безопасных, быстрых, и дешевых методов эффективного синтеза НЧ металлов. Методологическую основу работы формируют биотехнологические объекты и подходы, методы молекулярной биологии и геной инженерии, хроматографические, масс-спектрометрические методы, а также такие инструментальные аналитические методы как ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье, рентгеноструктурный и элементный анализ, методы трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, метод визуализации и анализа частиц в жидкостях. Для получения трансгенных культур и растений на стадии подготовки и анализа были задействованы программы GeneRunner, ClustalW2, VectorNTI. Для отслеживания активности пролиферации использовалась высокопроизводительная визуализация на платформе Cell-iQ®. Для статистической оценки использовался t-критерий Стьюдента, статистическую оценку выполняли с использованием Statistica версии 10.0.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Экстракт каллусной культуры *L. erythrorhizon* с высокой эффективностью индуцирует формирование монометаллических Ag-НЧ, Au-НЧ и биметаллических Ag/Au-НЧ; наиболее важным фактором для данного процесса является освещение реакционной смеси.

2. Восстановительный потенциал различных химических фракций экстракта воробейника увеличивается в ряду: нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и вторичные метаболиты, представленные производными кофейной кислоты.

3. Высокоочищенные индивидуальные полисахариды морских водорослей *S. cicharioides* и *F. evanescens* проявляют способность к синтезу монодисперсных Ag-НЧ.

4. Активация биосинтеза гинзенозидов в *rolC*-трансгенных корневых культурах женьшеня приводит к пропорциональному увеличению продукции Ag-НЧ.

5. НЧ, полученные с помощью клеточных культур растений, проявляют выраженную цитотоксическую, антибактериальную, фунгицидную и элиситорную активность.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечивается использованием разных современных методов исследования, взаимодополняющих друг друга, получены на современном оборудовании с использованием и стандартизированных и апробированных методик и программ, а также статистических методов при обработке получаемых данных и воспроизводимостью экспериментов. Фактические материалы, представленные в работе, полностью соответствуют протоколам исследований и записям в лабораторных журналах. Результаты, научные положения и выводы подкрепляются экспериментальными данными, приведенными в виде фотографий, рисунков и таблиц.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: XV Всероссийская молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014); VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015); Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по

естественным наукам (Владивосток, 2017) и международной конференции “Future of biomedicine” (Владивосток, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работы, из них 4 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК, и 4 тезисов научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 140 страницах, иллюстрирована 44 рисунками и 19 таблицами. Список литературы содержит 404 наименования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования использовали следующие растения, клеточные и тканевые культуры из коллекции отдела биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН: каллусную линию воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon* ВК-39 (Bulgakov et al., 2001), контрольные и *LoSilA1*-трансгенные *in vitro* растения и каллусные линии табака *Nicotiana tabacum* (Shkryl et al., 2017), нетрансформированную (1с) и *rolC*-трансгенный каллус и культуру бородатых корней женьшеня настоящего *Panax ginseng* (Bulgakov et al., 1998), каллусную культуру марены сердцелистной *Rubia cordifolia* (R) (Bulgakov et al., 2002), каллусную культуру резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* (At) (Bulgakov et al., 2012), каллусную культуру винограда культурного *Vitis vinifera* (Vv) (Makhazen et al., 2021), каллусную культуру артишока испанского *Cynara cardunculus* (Cyn) (Vereshchagina et al., 2014). Для изучения цитотоксической активности использовали клеточную линию эмбриональных фибробластов мыши 3Т3, линию клеток нейробластомы мыши N2A и линию клеток С6 глиомы крысы. Антибактериальную активность оценивали с использованием грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* XL-1 Blue и *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105. Грибные патогены пшеницы (*Triticum aestivum* L.) выделяли из семян с симптомами фузариоза. До состояния чистых культур всего было выделено 22 изолята, которые на основе последовательности гена β -тубулина относились к четырем видам рода *Fusarium*. Полисахариды ламинаран (ScL) и фукоидан (ScF) из водорослей *Sacharina cichorides*, фукоидан (FeF) и альгинат (FeA) из *Fucus evanescens* были выделены и охарактеризованы сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН (Sokolova et al., 2011).

Для получения НЧ металлов экстракты клеточных линий и растений, а также грубые фракции экстракта или очищенные полисахариды водорослей смешивали с 1 мМ растворами предшественников – нитрата серебра (AgNO_3 , Sigma-Aldrich) или хлористоводородной кислоты (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich), в соотношении 1:10 (об/об). Биметаллические Ag/Au-НЧ получали смешиванием растворов AgNO_3 и HAuCl_4 в молярных соотношениях 1:1, 1:4 и 4:1 (конечный объем 9 мл) с 1 мл экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon* ВК-39. Реакцию восстановления проводили при 25 °С в течение 24 часов, с постоянным перемешиванием (150 об/мин) и освещением (холодная белая люминесцентная лампа мощностью 11 Вт) или в темноте. После инкубации НЧ трижды очищали центрифугированием при 20000 об/мин в течение 20 минут с последующим повторным диспергированием осадка в стерильной дистиллированной воде. При микроволновом синтезе образцы нагревали в течение 5 минут в домашней микроволновой печи (LG MH-6353H), работающей при мощности 800 Вт и частоте 2450 МГц. Свойства биогенных НЧ оценивали с использованием различных инструментальных методов, включающих спектрофотометрию в УФ и видимой области с помощью BioSpec-nano (Shimadzu, Япония), ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье на спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Electron, США), анализ траектории НЧ с системой Nanosight NS500 (NanoSight, Великобритания), электронной микроскопию с помощью Hitachi S-5500 (Япония) и Libra 200 (Carl Zeiss, Германия), рентгеноструктурный анализ на дифрактометре Miniflex II

(Rigaku, Япония) и энергодисперсионную спектроскопию с помощью EDX-800HS-P (Shimadzu, Киото, Япония). Во всех методах определения использовали настройки приборов, рекомендованные фирмой-производителем для данного типа образцов. Цитотоксичность биосинтезированных металлических НЧ оценивали *in vitro* с использованием колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-анализ). Для отслеживания активности пролиферации использовали метод высокопроизводительной визуализации клеток на платформе Cell-iQ® (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия). Для изучения антибактериальной активности полученных Ag-НЧ использовали диско-диффузионный метод оценки. Кинетику роста бактерий в присутствии Ag-НЧ определяли путем измерения оптической плотности при 600 нм в течение 25 часов при помощи планшетного спектрофотометра Benchmark Plus (Bio-rad, калифорния, США). Фунгицидное действие Ag-НЧ оценивали в отношении изолированных и идентифицированных фитопатогенных грибов пшеницы, а именно *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides*. Процент ингибирования радиального роста (ИРР) рассчитывали, как разницу между диаметром мицелия контрольных и экспериментальных чашек относительно роста мицелия в контроле. Инфицированные семена пшеницы сортов Лира 98 x 334-84, Далира и Хабаровчанка x Монакинка с симптомами фузариоза помещали в раствор Ag-НЧ без какой-либо предварительной обработки или промывки. Были протестированы Ag-НЧ в концентрациях 100, 150 и 200 мкг/мл. Для сравнения в качестве положительного контроля использовали 0,2 % раствор диоксида. Необработанные семена использовали в качестве отрицательного контроля. Семена выдерживали в растворе наносеребра 1 час или 20 часов, или обрабатывали раствором диоксида в течение 3–5 минут. После обработки семена трижды промывали стерильной водой в течение 5 минут и помещали в твердую среду МС (таблица 7) без гормонов при 24 °С со световым режимом 16/8 (день/ночь). Элиситорную активность Ag-НЧ, полученных с использованием экстракта *L. erythrorhizon*, в отношении биосинтеза вторичных метаболитов определяли на модельных клеточных линиях *A. thaliana*, *V. vinifera* и *C. cardunculus*. В жидкие питательные среды в асептических условиях вносили стерильные растворы AgNO₃ или Ag-НЧ в концентрации 5, 15 и 30 мг/л (в/о по серебру). После двух недель роста (25°C, 120 об/мин, темнота) биомассу клеток отделяли от питательной среды, взвешивали, сушили теплым воздухом и проводили масс-спектрометрический анализ накопления вторичных метаболитов. Качественный и количественный анализ вторичных метаболитов клеточных культур и экстрактов анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения на приборе Shimadzu LCMS-IT-TOF (Япония) в режиме отрицательных ионов в условиях ионизации электрораспылением. УФ-видимые спектры и данные фрагментации MS² были получены с использованием аналитической системы ВЭЖХ 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), сопряженной с матричным фотодиодным детектором G1315D и масс-спектрометр с ионной ловушкой низкого разрешения HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Хроматографическое разделение проводили с использованием колонок для ВЭЖХ с обращенной фазой. Результаты экспериментов обработаны при помощи программы Statistica версии 10.0 (StatSoft Inc., США). Все значения выражены как среднее значение ± стандартная ошибка. Для проверки гипотезы о различии средних двух независимых выборок использовали t-критерий Стьюдента. Гипотезу о нормальности распределения данных проверяли с применением теста Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилкса. Для множественного сравнения средних значение проводили многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-хок тестом Фишера (PLSD). Уровень статистической значимости был установлен на уровне $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг восстановительной активности клеточных культур растений. Цель начального этапа работы состояла в проведении скрининга восстановительного потенциала

клеточных культур некоторых модельных и лекарственных растений из коллекции отдела биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Для изучения возможности получения НЧ металлов с использованием экстрактов были использованы клеточные культуры растений. В работе использовали каллусные культуры табака обыкновенного *Nicotiana tabacum*, марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, женьшеня настоящего *Panax ginseng*, винограда культурного *Vitis vinifera*, воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon* и резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* (рисунок 1А). Появление окраски реакционной смеси – от светло-желтой до темно-коричневой реакционной смеси от, связано с возбуждением поверхностных плазмонных колебаний, позволяющие визуально отслеживать формирование серебряных НЧ (Ag-НЧ) в растворе (рисунок 1Б). Измерение оптической плотности (ОП) (рисунок 1В) растворов выявило наличие характерной для Ag-НЧ полосы поглощения в районе 440 нм интенсивность которой варьировала от 0,69 до 4,71 в зависимости от типа культуры. Поскольку согласно наиболее выраженный восстановительный эффект наблюдался у *L. erythrorhizon*, для дальнейшего изучения формирования НЧ была выбрана именно эта культура.

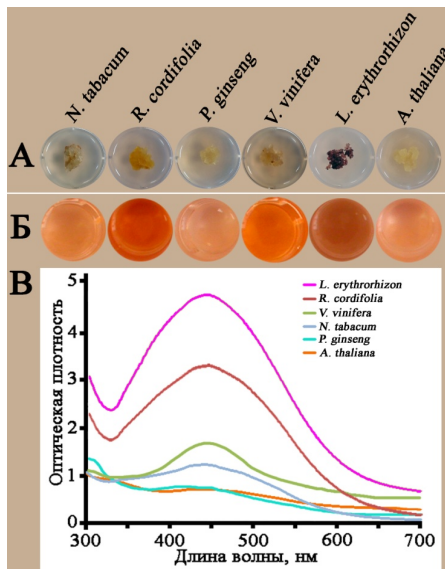


Рисунок 1 – Скрининг восстановительной активности клеточных культур растений. (А) Внешний вид клеточных культур растений, использованных для определения восстановительной активности. (Б) Интенсивность окраски растворов Ag-НЧ, полученных с помощью клеточных культур. (В) Спектры поглощения растворов Ag-НЧ.

Влияние условий реакции на получение Ag-НЧ и Au-НЧ. Водные экстракты каллусной культуры *L. erythrorhizon* кипяченые или некипяченые, приготовленные из свежей или сушеной каллусной ткани смешивали с растворами нитрата серебра или золотохлористоводородной кислоты, затем реакционные смеси инкубировали при постоянном освещении или в его отсутствии и с постоянным перемешиванием. Характерную полосу поверхностного плазмонного резонанса (ППР) восстановленных Ag-НЧ наблюдали при 443–445 нм для реакций, проводимых во всех испытанных условиях. Характерная полоса ППР восстановленных золотых НЧ (Au-НЧ) варьировала от 538 до 567 нм в зависимости от условий эксперимента. Интересно, что как температура экстракции, так и световые условия инкубации существенно влияли на эффективность реакций восстановления (рисунок 2). Мы обнаружили, что в целом кипяченый экстракт демонстрировал лучшую восстановительную способность, по сравнению с некипяченым экстрактом во всех экспериментальных условиях. Кроме того, реакционные смеси, которые инкубировали в темноте, имели значительно менее интенсивный цвет, в отличие от тех, которые инкубировали при освещении. Этот эффект был особенно значительным в случае Ag-НЧ, поскольку их формирование в темноте было возможно только при использовании кипяченого экстракта из высушенной биомассы. Однако при постоянном освещении более важным для восстановления ионов золота было кипячение экстракта. Еще один важный

фактор, который следует учитывать при биосинтезе металлических НЧ – это микроволновое облучение. Действительно, обработка микроволнами в течение 5 минут приводила к быстрому изменению цвета раствора от бесцветного до желтовато-коричневого и красного винного цвета для прекурсоров серебра и золота, соответственно (рисунок 2). Однако итоговая эффективность такого способа биовосстановления была сопоставима с длительной инкубацией (для Au-НЧ) или даже ниже (для Ag-НЧ). Эти результаты показывают, что синтез с помощью микроволнового излучения имеет преимущество с точки зрения времени, необходимого для получения наноструктур золота, но световое облучение является более важным физическим фактором, чем нагрев, для восстановления ионов-предшественников в случае образования Ag-НЧ.

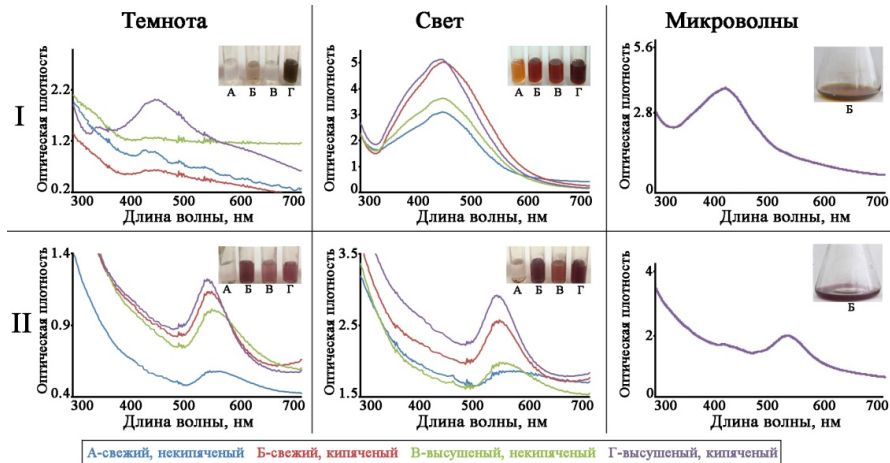


Рисунок 2 – Спектры поглощения Ag-НЧ (А) и Au-НЧ (Б), полученных с использованием каллусной культуры *L. erythrorhizon* в различных условиях. Реакции проводили в темноте или при постоянном освещении. Для приготовления экстракта использовали свежую и высушенную биомассу клеток. Экстракт кипятили или оставляли некипяченым перед смешиванием с соответствующими растворами предшественников. Реакцию также проводили под влиянием микроволнового излучения. Синим цветом обозначены спектры поглощения Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием некипяченого экстракта из свежесобранной биомассы, красным – кипяченого экстракта из свежесобранной биомассы, зеленым – некипяченого экстракта из высушенной биомассы, фиолетовым – кипяченого экстракта из высушенной биомассы.

Характеристика Ag-НЧ и Au-НЧ. Форму и размер биосинтезированных Ag-НЧ и Au-НЧ изучали после инкубации с экстрактом каллуса *L. erythrorhizon* с помощью трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии (ТЕМ – transmission electron microscopy). Анализ Ag-НЧ показал образование преимущественно сферических частиц размером от 20 до 50 нм (рисунок 3ТЕМ). ТЕМ-изображения показали, что Au-НЧ представлены структурами треугольной, сферической и пятиугольной формы в диапазоне размеров 10–45 нм (рисунок 3ТЕМ). Распределение частиц по размерам было дополнительно изучено с помощью анализа траекторий движения НЧ (NTA – nanoparticle tracking analysis) (рисунок 3NTA). Средний размер синтезированных НЧ измеренных с помощью данного подхода составил 85 ± 9 нм для Ag-НЧ и 108 ± 12 нм для Au-НЧ. Расчётные величины дзета-потенциал Ag-НЧ и Au-НЧ составил -27 мВ и -31 мВ, соответственно. Таким образом, высокие значения дзета-потенциала биосинтезированных НЧ указывают на наличие сильных отталкивающих сил между частицами в коллоидном растворе, что должно предотвращать их агрегацию и, таким образом, обеспечивать высокую степень стабильности.

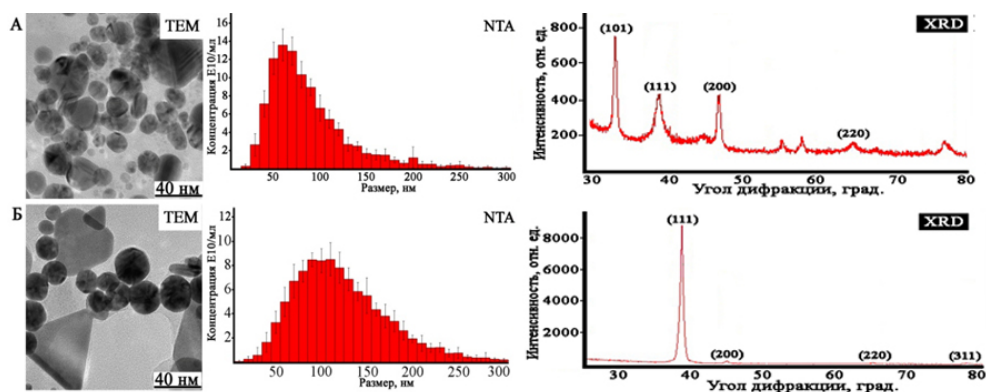


Рисунок 3 – Анализ Ag-НЧ (А) и Au-НЧ (В), полученных с использованием экстракта каллусной культуры *L. erythrorhizon*. TEM – изображения Ag-НЧ и Au-НЧ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; NTA – распределение размеров Ag-НЧ и Au-НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; XRD – рентгеновские дифракционные спектры Ag-НЧ.

Для определения кристаллической структуры полученных НЧ использовали метод рентгеноструктурного анализа (XRD – X-ray diffraction) (рисунок 3XRD). Дифракционные пики при значениях 2θ $38,18^\circ$, $44,12^\circ$ и $64,55^\circ$ соответствуют плоскостям решетки (111), (200) и (220) гранецентрированной кубической (ГЦК) структуры Ag-НЧ. Аналогичные дифракционные пики при значениях 2θ $38,24^\circ$, $44,48^\circ$, $64,71^\circ$ и $77,70^\circ$ соответствуют плоскостям брэгговского отражения (111), (200), (220) и (311) ГЦК-структуры Au-НЧ. Для выявления возможных биомолекул, участвующих в восстановлении и стабилизации металлических НЧ, опосредованных экстрактом каллуса *L. erythrorhizon* проводили анализ частиц с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy). Спектры FTIR Ag-НЧ показали характерные пики, указывающие на присутствие полифенольных соединений, белков и полисахаридов, адсорбированных на поверхности НЧ.

Поскольку экстракт клеточной культуры *L. erythrorhizon* вызывает образование монометаллических НЧ, мы изучили его способность синтезировать биметаллические нанокристаллы с молярным соотношением серебро/золото 4:1, 1:1 и 1:4. Типы полученных спектров поглощения, показывающие в основном один хорошо различимый пик ППР, расположенный на той же длине волны, что и Au-НЧ, указывает на то, что полученные биметаллические НЧ могут иметь структуру ядро-оболочка (серебряное ядро, покрытое золотой оболочкой). Биметаллические Ag/Au-(4:1)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ имели преимущественно сферическую и эллиптическую форму и, в меньшей степени, треугольную, пентагональную и гексагональную, в то время как Ag/Au-(1:4)-НЧ представлены в основном треугольными, пятиугольными и шестиугольными структурами (рисунок 4). Размеры биметаллических НЧ (рисунок 4) находились в диапазоне от $3,0 \pm 0,2$ до $45,0 \pm 1,3$ нм. Средние размеры биметаллических Ag/Au-НЧ в соотношении 4:1, 1:1 и 1:4 составили 89 ± 11 нм, 73 ± 11 нм и 84 ± 6 нм, соответственно. Значение дзета-потенциала для Ag/Au-НЧ с соотношением 4:1, 1:1 и 1:4 составило $-32,06$ мВ, $-30,44$ мВ и $-29,41$ мВ, соответственно.

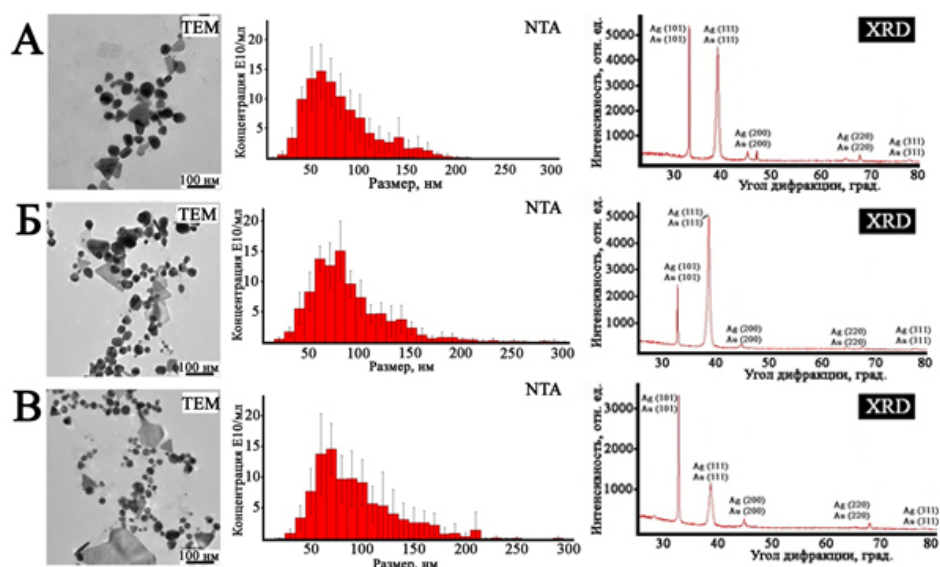


Рисунок 4 – Анализ биметаллических Ag/Au-НЧ, полученных с использованием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*. TEM – изображения биметаллических НЧ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; NTA – распределение размеров биметаллических НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; XRD – рентгеновские дифракционные спектры Ag-НЧ. (А) – Ag/Au-(4:1)-НЧ, (Б) – Ag/Au-(1:1)-НЧ, (В) – Ag/Au-(1:4)-НЧ

Кристаллическую структуру, биосинтезированных биметаллических Ag/Au-НЧ, оценивали с помощью рентгеноструктурного анализа. Как показано на рисунке 4, биогенные НЧ показали типичные дифракционные пики во всем спектре значений 2θ , соответствующие плоскостям брэгговского отражения (111), (200), (220) и (311) ГЦК структуры Ag и Au. Спектр FTIR Ag/Au-НЧ напоминают спектры индивидуальных Ag-НЧ и Au-НЧ, что говорит о едином молекулярном механизме формирования моно- и биметаллических НЧ под действием экстракта клеточной культуры *L. erythrorhizon*.

Восстановительная активность отдельных компонентов каллусной культуры *L. erythrorhizon*. Чтобы оценить роль некоторых соединений, таких как нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и вторичные метаболиты, содержащихся в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon* и способных участвовать в образовании НЧ, мы проанализировали их содержание и восстановительный потенциал по отношению к ионам серебра. Концентрацию нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов определяли спектрофотометрическими методами (рисунок 5). Молекулы ДНК/РНК были наименее распространенными соединениями экстракта. Чтобы проверить нативность образца ДНК, была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами, специфичными к последовательности внутреннего транскрибированного спейсера ядерной рибосомной ДНК растения. Этот эксперимент позволил нам подтвердить, что экстракт *L. erythrorhizon* содержит высокомолекулярную ДНК, пригодную для ПЦР-анализа. Белки, представленные в экстракте *L. erythrorhizon*, анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), а их количество определяли с помощью метода Брэдфорда. ПААГ электрофорез показал, что экстракт содержал значительное количество белков, которые были частично разрушены. Анализ фракции вторичных метаболитов был проведен методом ВЭЖХ-МС. На хроматографическом профиле можно отметить присутствие трех основных пиков, которые были идентифицированы как производные кофейной кислоты: рабдозин (1), розмариновая кислота (2) и метилрозмаринат (3). Оставшиеся второстепенные пики, показанные на рисунке 10, были отнесены к производным шиконифурана – шиконифурану D (4), шиконифурану E (5), шиконифурану C (6) и производным шиконина – гидроксизовалерилшиконину (7), ацетилшиконину (8), изобутирилшиконин (9) и

изовалерилшиконин (10). Далее мы исследовали восстановительную способность каждой из выделенных молекулярных фракций на примере ионов серебра. Для фракций нуклеиновых кислот и белков были получены очень низкие пики поглощения. В то же время фракции полисахаридов и вторичных метаболитов, были способны продуцировать большое количество Ag-НЧ. В целом, наши результаты показывают, что фитохимические вещества из клеточной культуры *L. erythrorhizon*, включая высокомолекулярные полисахариды, белки и, в меньшей степени, нуклеиновые кислоты, а также низкомолекулярные полифенольные соединения, представленные рабдозином, розмариновой кислотой, и метилросмаринат проявляют синергетический восстановительный потенциал во время биологического синтеза монометаллических и биметаллических НЧ.

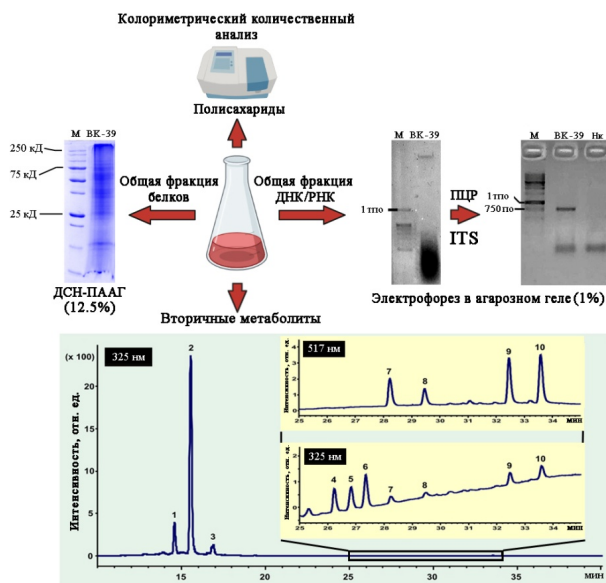


Рисунок 5 – Анализ нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и вторичных метаболитов, представленных в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon*.

Получение Ag-НЧ с использованием полисахаридов морских водорослей. Наши результаты показали, что наиболее активными восстановителями культивируемых клеток растений являются полисахариды и вторичные метаболиты (рисунок 15). Однако если принять во внимание относительное содержание этих компонентов в экстракте *L. erythrorhizon*, фактический вклад полисахаридов в восстановительный потенциал оказывается почти в два раза выше. Мы решили подробнее изучить особенности восстановления ионов серебра под действием индивидуальных, а не суммарных полисахаридов, чтобы выявить наличие возможной связи структура-функция в процесс реакции. Поскольку индивидуальные полисахариды воробейника не изучены, в качестве модели для этих исследований были выбраны полисахариды водорослей. В работе использовали высокоочищенные фракции альгината (FeA) и фукоидана (FeF) выделенные из *Fusarium evanescens*, а также ламинаран (ScL) и фукоидан (ScF) – из *Saccharina cichorioides*. Спектры поглощения синтезированных Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF и Ag-НЧ-ScL имели максимумы поглощения при 408, 402, 412 и 414 нм, соответственно (рисунок 6). Следует отметить, что при равных условиях реакции оптическая плотность Ag-НЧ-FeA была в 3,18, 3,72 и 8,75 раза выше, по сравнению с Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF и Ag-НЧ-ScL, соответственно. В то же время восстановительные свойства фукоиданов *F. evanescens* и *S. cichorioides* были практически одинаковыми. Они превосходили восстановительную силу ламинарана из *S. cichorioides* на 2,74 и 2,35, соответственно. Низкую восстановительную активность ламинарана можно объяснить тем, что он является низкомолекулярным и незаряженным полисахаридом. В свою очередь, фукоиданы представлены сульфатированными фукозосодержащими гетерополимерами средних размеров, в то время как альгинаты относятся к высокомолекулярным карбоксилированным гетерополимерам.

Вследствие чего можно сделать вывод, что молекулярная масса и структурные характеристики влияют на восстановительные свойства полисахаридов.

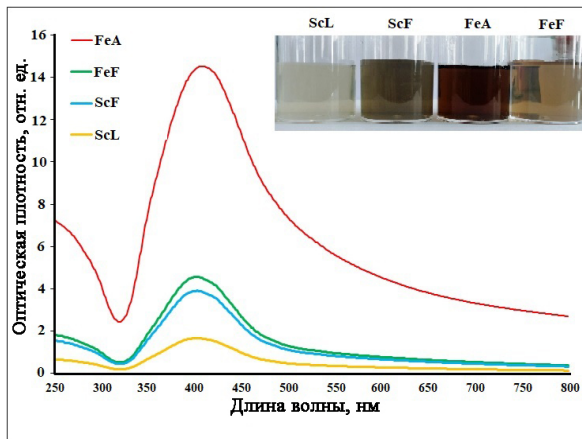


Рисунок 6 – Спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием альгината (FeA) и фукоидана (FeF) из *F. evanescens*, фукоидана (ScF) и ламинарана (ScL) из *S. cicharioides*. Изображение на вставке представляет внешний вид соответствующих коллоидных растворов Ag-НЧ. Желтой линией показан коллоидный раствор Ag-НЧ, полученных с использованием полисахаридов ScL, голубой – ScF, зеленой – FeF, красной – FeA.

Спектры FTIR, полученные для всех Ag-НЧ, а также спектры исходных полисахаридов показали несколько характерных пиков, которые однозначно указывают на участие исследуемых молекул в процессе формирования НЧ. На ТЕМ-микрофотографиях (рисунок 7) Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-ScL, можно наблюдать преобладание частиц сферической формы со средним размером 57 ± 9 , 64 ± 6 , 53 ± 4 , 45 ± 2 нм, соответственно. Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными с помощью NTA-анализа распределения размеров частиц (рисунок 7). Дзета-потенциал для всех Ag-НЧ находился в диапазоне от -27 до -30 мВ. На рисунке 7 также приведены спектры XRD, полученных НЧ. Пики Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScL во всем спектре значений 2θ были отнесены к (111), (200), (220) плоскостям брэгговского отражения ГЦК металлической структуры серебра.

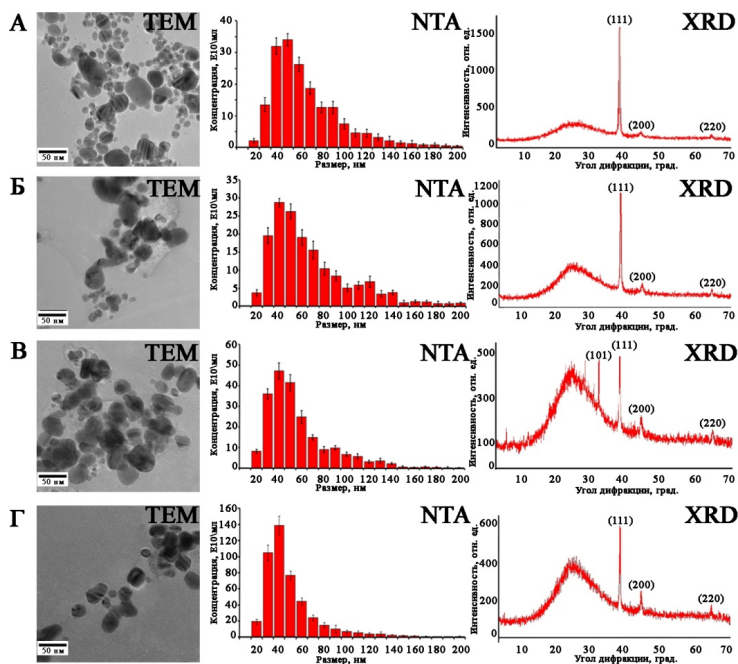


Рисунок 7 – Ag-НЧ, полученные с использованием альгината из *F. evanescens* (A), фукоидана из *F. evanescens* (B), фукоидана из *S. cichorioides* (C), ламинарана из *S. cichorioides* (D). TEM – изображения НЧ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; NTA – распределение размеров НЧ, полученное на основе анализа траекторий движения НЧ; XRD – рентгеновские дифракционные спектры Ag-НЧ.

Получение Ag-НЧ с использованием клеточных культур *P. ginseng*. Мы выяснили, что очищенные растительные полисахариды действительно могут успешно применяться для получения НЧ металлов. С другой стороны, мы хотели впервые испытать возможность биоинженерии восстановительной активности клеток посредством методов геной

инженерии. С этой точки зрения, полисахариды представлялись не очень удобными молекулами, поскольку особенности их накопления в культуре растительных клеток изучено слабо, а значит, и отсутствуют сведения о надежных генетических регуляторах этого процесса. При этом вторичные метаболиты являются более доступным объектом регулирования. В качестве модели для проверки нашего предположения, мы использовали клеточные культуры лекарственного растения женьшеня настоящего *Panax ginseng*, поскольку для этого растения были доступны как нетрансформированные (контрольные) каллусы, так и *rolC*-трансгенные каллусы и бородачатые корни. Исследование проводили на примере восстановления ионов серебра. Как и ранее, при инкубации реакционных смесей, содержащих экстракты клеточных культур женьшеня и раствор предшественника, наблюдали динамическое изменение цвета различной интенсивности (рисунок 8). По интенсивности пиков ППР восстановительная способность культуры бородачатых корней оказалась в 2,8 раза выше, чем у экстрактов из 1с и *rolC*-каллусов. Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект связан с повышенной способностью бородачатых корней различных видов растений к накоплению вторичных метаболитов. Таким образом, бородачатые корни могут обеспечить альтернативный способ производства восстанавливающих веществ, участвующих в биосинтезе НЧ.

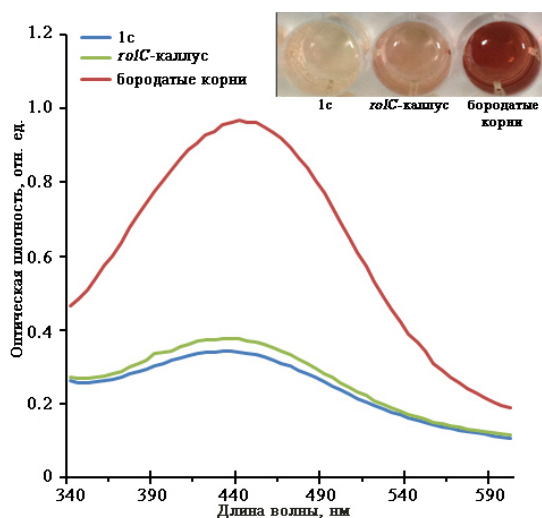


Рисунок 8 – Спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием экстрактов из клеточных линий *P. ginseng* 1с, *rolC*-каллусов и бородачатых корней.

Кристаллическая структура Ag-НЧ была подтверждена методом XRD, с помощью которого были обнаружены пики совпадающие с плоскостями отражения Брэгга (101), (111), (200) и (220) ГЦК структуры металлического серебра. Распределение размеров НЧ, а также их концентрацию в образцах оценивали с помощью метода NTA. Средний размер Ag-НЧ, продуцируемых экстрактами 1с, *rolC*-каллусов и бородачатых корней, составлял 89 ± 8 , 74 ± 6 и 52 ± 6 нм, соответственно, а их концентрация была равна $2,38 \times 10^8$, $2,79 \times 10^8$ и $4,48 \times 10^8$ частиц/мл, соответственно. Таким образом, концентрация Ag-НЧ в полученных коллоидных растворах, определенная с помощью NTA, коррелировала со значениями оптической плотности соответствующих полос ППР (рисунок 8). Стабильность коллоидных растворов НЧ женьшеня исследовали с помощью измерения дзета-потенциала. Было обнаружено, что значение дзета-потенциала составляло $-15,86$ мВ, $-14,56$ мВ и $-23,38$ мВ для Ag-НЧ, синтезированных с использованием 1с, *rolC*-каллусов и бородачатых корней, соответственно. Для идентификации биомолекул женьшеня, участвующих в восстановлении и стабилизации ионов серебра, проводили исследование частиц с помощью FTIR анализа, который выявил присутствие, главным образом, полисахаридов и полифенольных соединений.

Восстановительные свойства трансгенных растений табака, экспрессирующих ген силикатеина. Согласно нашим данным по вкладу различных биомолекул в

восстановительный потенциал каллусной культуры воробейника, активность белков была незначительна по сравнению с полисахаридами и особенно вторичными метаболитами. Однако общее содержание белков в экстракте оказалось, сравнительно велико и было сопоставимо с таковым у полисахаридов. С учетом этого фактора вклад белков в биосинтетическую активность культуры *L. erythrorhizon* всего в два раза уступал вторичным метаболитам. К тому же из литературных источников было известно, что некоторые белки способны индуцировать формирование НЧ металлов. Например, силикатеин из морских губок инициировал формирование Au-НЧ в условиях *in vitro* (Tahir *et al.*, 2006). Нами ранее было установлено, что гетерологичная экспрессия гена силикатеина *Al* из морской губки *Latrunculia oparinae*, почти в 4 раза увеличивает способность трансгенных каллусов табака к продукции Ag-НЧ (Shkryl *et al.*, 2018). Мы предположили, что *LoSilAl*-трансгенные растения табака также будут обладать повышенной способностью к формированию Ag-НЧ. В мировой практике эта работа стала первой по получению биогенных с помощью трансгенных растений. Однако, исследованные нами экстракты растений не вызывали изменения цвета реакционных смесей, характерного для каллусных культур. Вместо этого мы наблюдали образование коричневого осадка на дне и налета на стенках реакционных сосудов (рисунок 9А). Полученные растворы сами по себе не показывали типичных полос ППР характерных для Ag-НЧ. Однако при воздействии на осадки ультразвукового излучения, нам удалось добиться их частичного растворения. При этом формы полос ППР Ag-НЧ были широкими, а их максимумы не отличались у контрольных и трансгенных растений (рисунок 9Б).

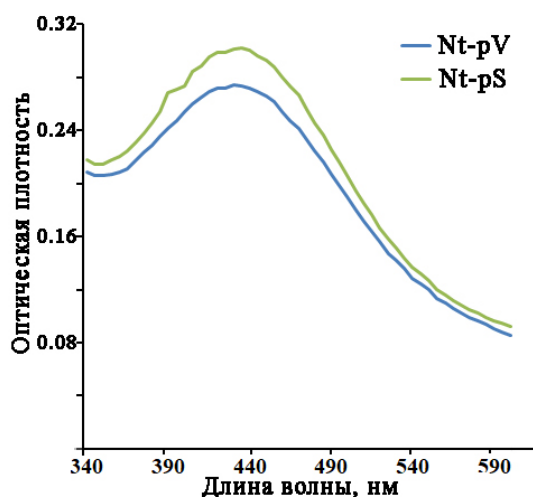
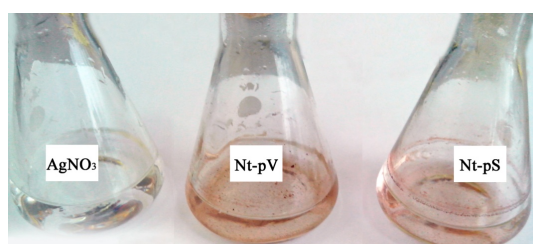


Рисунок 9 – Получение Ag-НЧ с помощью *LoSilAl*-трансгенных растений табака. Типичные изображения растворов Ag-НЧ, полученных с использованием трансгенных растений Nt-pV и Nt-pS (А). Спектры поглощения Ag-НЧ, полученных с использованием трансгенных растений Nt-pV и Nt-pS (Б).

Элиситорная активность Ag-НЧ. Поскольку биосинтез ценных биологически-активных соединений имеет важное значение в биотехнологии растений, мы решили изучить способны ли Ag-НЧ, полученные биологическим способом оказывать влияние на накопление вторичных метаболитов. В качестве экспериментальных культур модельных и лекарственных растений нами были выбраны культуры *A. thaliana*, *V. vinifera* и *C. cardunculus*. Для элиситорной активности использовали ионное серебро в форме нитрата серебра. Как Ag^+ , так и Ag-НЧ оказывали значительное влияние на накопление вторичных метаболитов в изученных клеточных культурах. В культуре артишока (таблица 1) максимальный положительный эффект на накопление кафеилхинных кислот в 5,9 раз

наблюдали при добавлении 5 мкг/мл AgNO₃, однако действие Ag-НЧ было менее значительным и НЧ стимулировали накопление лишь в 4,5 раза относительно контроля. В культуре винограда даже минимальная доза AgNO₃ и Ag-НЧ повысила накопление стильбенов в 33 и 27 раз, соответственно (таблица 15). Как и в случае с культурой артишока, нитрат серебра оказался более мощным элиситором и оказал наибольшее влияние в дозе 5 мкг/мл, при которой общее содержание стильбенов выросло в 55 раз, тогда как Ag-НЧ только в 44 раза. Что касается культуры арабидопсиса (таблица 1), было установлено, что оба элиситора проявляли дозозависимое стимулирующее действие на накопление индольных глюкозинолатов. Стоит отметить, что минимальная концентрация AgNO₃ и Ag-НЧ вызывала наибольший стимуляторный эффект на накопление вторичных метаболитов – в 1,8 и 2,9 раза, соответственно.

Таблица 1 – Влияние AgNO₃ и Ag-НЧ на накопление вторичных метаболитов в клеточных культурах растений.

Элиситор, мг/л		Контр.	AgNO ₃			Ag-НЧ		
		0	5	15	30	5	15	30
<i>C. cardunculus</i>	Сухая биомасса, г/л	69,10 ± 4,00	30,07 ± 2,53*	15,70 ± 2,47*	14,13 ± 1,33*	37,97 ± 2,67*	12,13 ± 0,92*	12,97 ± 1,60*
	Сумма кафеилхинных кислот [†] , мг/г	4,16 ± 0,17	24,60 ± 1,45*	14,46 ± 1,59*	9,61 ± 0,63*	18,72 ± 0,92*	11,08 ± 0,59*	9,98 ± 0,90*
	Продукт-ть, мг/л	287,46 ± 16,64	739,64 ± 62,32*	227,02 ± 35,67	135,82 ± 12,81*	710,74 ± 49,92*	134,44 ± 10,16*	129,41 ± 16,63*
<i>V. vinifera</i>	Сухая биомасса, г/л	17,82 ± 1,64	16,72 ± 1,17	6,34 ± 0,58*	6,92 ± 1,17*	18,08 ± 1,34	8,09 ± 0,79*	6,78 ± 1,14*
	Сумма стильбенов ^{††} , мкг/г	22,3 ± 1,2	740,9 ± 30,31*	1127,9 ± 60,61*	1220,0 ± 117,04*	609,9 ± 26,27*	337,9 ± 19,09*	979,4 ± 96,16*
	Продукт-ть, мг/л	0,40 ± 0,04	12,39 ± 0,89*	7,15 ± 0,66*	8,44 ± 1,42*	11,03 ± 0,81*	2,73 ± 0,27*	6,64 ± 1,12*
<i>A. thaliana</i>	Сухая биомасса, г/л	8,40 ± 1,17	12,10 ± 2,00	4,07 ± 0,73*	4,80 ± 1,13*	12,43 ± 1,67	6,15 ± 1,28*	4,82 ± 1,33*
	Сумма индольных глюкозинолатов ^{†††} , мкМ/г	3,31 ± 0,32	6,07 ± 0,70*	4,65 ± 0,59	4,81 ± 0,79	9,75 ± 0,91*	2,77 ± 0,40	4,14 ± 0,80
	Продукт-ть, мг/л	27,80 ± 3,86	73,45 ± 12,14*	18,91 ± 3,41*	23,09 ± 5,45	121,23 ± 16,25*	17,04 ± 3,55*	19,94 ± 5,52

[†] Сумма 3-, 5-моно- и 1,3-, 1,4-, 1,5-, 3,4-, 3,5-, 4,5-ди-кафеилхинных кислот. ^{††} Сумма т-резвератрол ди-гликозида, пицеида, т-резвератрола, виниферина и тримеров резвератрола. ^{†††} Сумма индолил-3-метилглюкозинолат глюкобрассицина, 4-метоксииндолил-3-метилглюкозинолат 4-метоксиглюкобрассицина и 1-метоксииндолил-3-метилглюкозинолат неоглюкобрассицина.

Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка, * $P < 0,05$.

Стоит отметить, что во всех случаях увеличение концентрации элиситора сопровождалось некоторым снижением его стимулирующей активности. Сильнее всего такое обратно пропорциональное влияние эффекторов на биосинтез заметно в опытах с культурой арабидопсиса где при дозе 30 мкг/мл общее содержание глюкозинолатов достоверно не отличалось от контрольных условий. Предполагается, что НЧ воздействуют на вторичный метаболизм клеток растений посредством активации продукции АФК

(Marslin, Sheeba and Franklin, 2017). В этой связи можно предположить, что избыточная продукция АФК приводит к угнетению клеточных процессов, в т.ч. биосинтеза низкомолекулярных соединений.

Цитотоксическая активность Ag-НЧ и Au-НЧ, полученных с использованием каллусной культуры воробейника. Цитотоксичность биосинтезированных металлических НЧ оценивали *in vitro* в отношении клеточных линий нейробластомы (N2A) и эмбриональных фибробластов (3T3) мыши с использованием МТТ-анализа. В большинстве случаев НЧ снижали жизнеспособность клеток N2A и NIH 3T3 дозозависимым образом (рисунок 33). В частности, обработка культур 3T3 и N2A биметаллическим Ag/Au-(1:4)-НЧ и Ag/Au-(1:1)-НЧ не вызывали гибели клеток при концентрации 1 мкг/мл, но значительно ($P < 0,0001$) снижали жизнеспособность клеток при 5 мкг/мл и более высоких дозах. Стоит отметить, что в исследуемых условиях наибольший цитотоксический эффект в обеих клеточных линиях проявил препарат Ag/Au-(4:1)-НЧ. Существенных различий в токсичности биосинтезированных НЧ в клетках нейробластомы и эмбриональных фибробластов не обнаружено. Au-НЧ обладали самой низкой цитотоксичностью среди протестированных НЧ. При этом все исследованные образцы НЧ не оказывали существенного влияния на миграцию клеток фибробластов *in vitro*. Известно, что НЧ способны выделять ионы металлов в цитозоле и в ядре (Elangovan K. et al., 2015). Такие ионы легко взаимодействуют с азотистыми основаниями и фосфатными группами ДНК. Кроме того, ионы металлов способны взаимодействовать с функциональными группами белков внутри клетки, включая те, которые аномально экспрессируются во время неопластической трансформации, тем самым подавляя их активность (Szucova et al., 2006). С другой стороны, известно, что металлические НЧ вызывают окислительный стресс, который может представлять собой основной фактор, лежащий в основе их противоопухолевой активности (Xia, Ma and Wang, 2016). Ag-НЧ, Au-НЧ и Ag/Au-НЧ могут индуцировать генерацию активных форм кислорода посредством Фентон-подобных процессов (Navalon et al., 2010), с последующим окислением белков и липидов, повреждением молекул ДНК и, как следствие, активацией путей, ведущих к гибели клеток через апоптоз, некроз и аутофагию (Mohammadinejad et al., 2018).

Цитотоксическая активность Ag-НЧ, полученных с использованием индивидуальных полисахаридов бурых водорослей. Цитотоксичность оценивали *in vitro* в отношении клеток глиомы крысы (С6). Мы обнаружили, что Ag-НЧ-FeA и Ag-НЧ-ScL оказывали значительный дозозависимый цитотоксический эффект на клетки С6. В случае Ag-НЧ-FeA максимальная цитотоксичность была достигнута при дозе 50 мкг/мл, тогда как Ag-НЧ-ScL продемонстрировали высокий цитотоксический эффект уже при 25 мкг/мл. В то же время токсичность Ag-НЧ-FeF и Ag-НЧ-ScF на клеточную линию С6 была менее выраженной. В частности, Ag-НЧ-FeF при 50 мкг/мл подавляли жизнеспособность клеток в 1,2 раза, однако полное подавление роста было достигнуто только при использовании 100 мкг/мл. Ag-НЧ-ScF продемонстрировал дозозависимую цитотоксичность, но гораздо менее значительную, по сравнению с другими образцами Ag-НЧ, т.к. клетки С6 продемонстрировали отличную жизнеспособность после обработки Ag-НЧ вплоть до 100 мкг/мл. Известно, что все полисахариды бурых водорослей практически нетоксичны (Malyarenko and Ermakova, 2017). Вероятно, наблюдаемые отличия в цитотоксичности связаны с различием физико-химических параметров НЧ, полученных с разными матрицами.

Антибактериальная активность Ag-НЧ. Далее мы изучили антибактериальные свойства биогенных Ag-НЧ в отношении штаммов грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* XL1 Blue и *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Было установлено, что все НЧ обладали выраженным биоцидным действием. Например, для образцов Ag-НЧ-FeA, Ag-НЧ-FeF, Ag-НЧ-ScF, Ag-НЧ-ScL при концентрации 20 мкг/диск средняя зона ингибирования роста обеих бактерий составляла 8, 7, 3 и 6 мм, соответственно. Тогда как в случае с Ag-НЧ, полученными с помощью трансгенных каллусов табака, только 2 мм, что говорит о меньшей

биоцидной активности по сравнению с полисахаридными НЧ. Концентрация полумаксимального ингибирования (IC50) этих частиц для *E. coli* и *A. tumefaciens* составила 7 и 4 мкг/мл, соответственно. В целом, антибактериальный эффект биогенных Ag-НЧ сопоставим с результатами других авторов (Ahmed et al., 2016; Lomeli-Rosales et al., 2019).

Фунгицидная активность Ag-НЧ. Для изучения фунгицидных свойств Ag-НЧ использовали грибковых патогенов, ассоциированных сортами пшеницы: Лира 98 x 334-84, Далира и Хабаровчанка x Монакинка, произрастающими на территории Дальнего Востока. На основе частичных нуклеотидных последовательностей гена β -тубулина нами было идентифицировано четыре изолята фитопатогенных грибов: *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides* и *F. poae*. Противогрибковая эффективность Ag-НЧ, полученных с использованием культуры бородатых корней *P. ginseng*, оценивали путем измерения радиального роста мицелия в присутствии различных концентраций наносеребра. В целом Ag-НЧ продемонстрировали четкую дозозависимую противогрибковую активность. Однако фунгицидные свойства биосинтезированных Ag-НЧ в отношении разных видов *Fusarium* варьировали и уменьшались в следующем порядке: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides* (рисунок 10). Так, для *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* 100% ингибирование роста наблюдалось при дозе 50 мкг/мл, в то время как даже 100 мкг/мл Ag-НЧ подавляли рост *F. sporotrichioides* только на 88%.

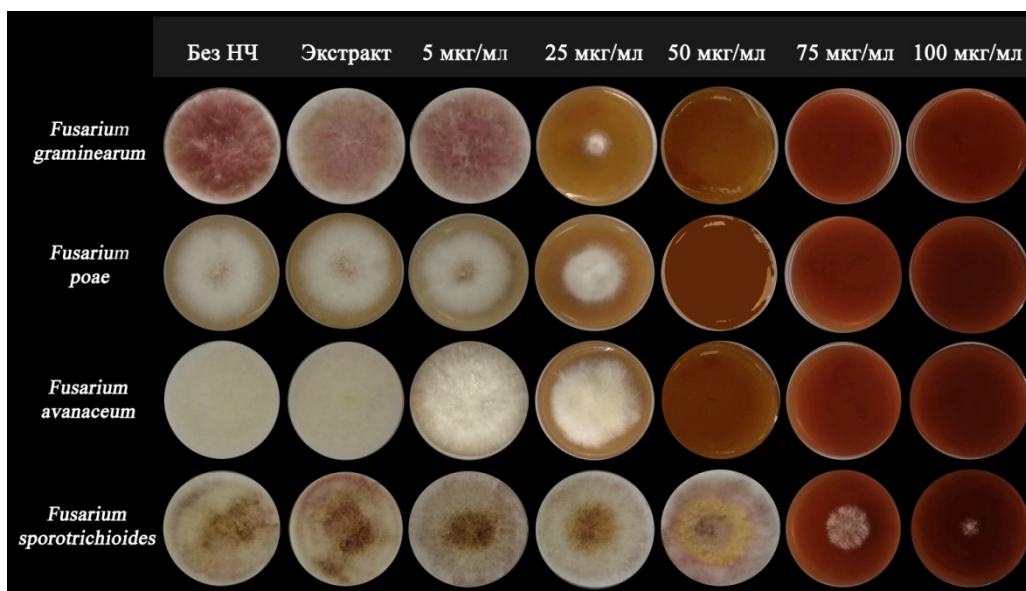


Рисунок 10 – Фунгицидная активность различных концентраций Ag-НЧ (5, 25, 50, 75 и 100 мкг/мл), полученных с использованием экстракта бородатых корней *P. ginseng*, в отношении грибов *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum* и *F. sporotrichioides*.

Поверхностная стерилизация семян пшеницы. Обработка фунгицидами до сих пор является наиболее популярным способом борьбы с инфекциями, передаваемыми через семена (Malyarenko and Ermakova, 2017). Однако вредное воздействие этих соединений на проростки пшеницы, развитие устойчивости у патогенов, а также токсичность и потенциальный риск для природы и людей от широкого использования фунгицидов способствует разработке новых и инновационных фунгицидов для сельского хозяйства. Для дезинфекции семена инкубировали в течение 1 или 20 часов с частицами в концентрации 100, 150 и 200 мкг/мл при непрерывном перемешивании в темноте. В качестве положительного контроля противогрибковой активности использовали 0,2% раствор диоксида. Необработанные семена использовали в качестве отрицательного контроля. Обработанные и необработанные семена помещали на среду для проращивания и инкубировали в течение 5 дней для выявления грибковой инфекции. Диоксид полностью подавлял рост грибов в обработанных проростках пшеницы, однако эти растения

проявляли задержку прорастания семян. Необработанные семена демонстрировали высокий уровень грибковой инфекции на третий день культивирования, которая в дальнейшем прогрессировала и значительно снижала рост проростков пшеницы (рисунок 11). Аналогичным образом, стерилизация наносеребром в течение 1 часа не оказала значительного противогрибкового эффекта через 5 дней, хотя и немного замедлила рост грибов в начале прорастания. Напротив, воздействие всех испытанных концентраций НЧ в течение 20 часов показало превосходные фунгицидные свойства, сравнимые с действием диоксида, без каких-либо заметных эффектов на прорастание проростков.

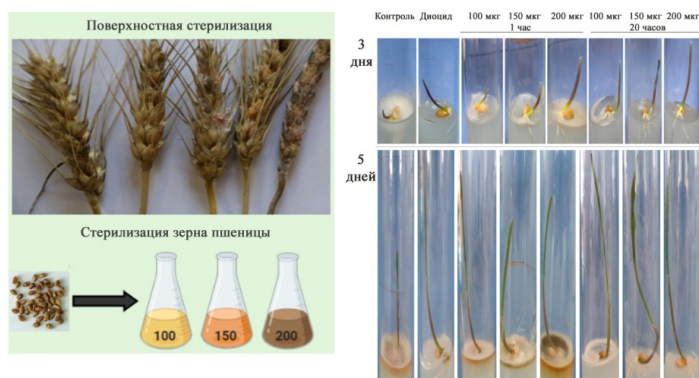


Рисунок 11 – Противогрибковый потенциал Ag-НЧ для поверхностной стерилизации семян пшеницы. Инфицированные семена инкубировали в течение 1 или 20 часов в водном растворе Ag-НЧ с концентрациями 100, 150 или 200 мкг/мл в темноте.

Фузариоз колосьев является одним из наиболее распространенных и опасных заболеваний пшеницы во всем мире (Pathak and Zaidi, 2012). Наши результаты доказывают, что Ag-НЧ, полученные биотехнологическим способом, можно рассматривать как экологически чистое дезинфицирующее средство для борьбы с грибковыми заболеваниями сельскохозяйственных культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скрининг биосинтетической активности клеточных культур растений показал, что наивысшим потенциалом обладают клеточные культуры воробейника и марены сердцелистной, тогда как каллусы женьшеня и арабидопсиса проявляли только следовую активность. Используя культуру воробейника в качестве модельной системы, мы изучили влияния ряда факторов на эффективность формирования НЧ. Было установлено, что использование высушенных клеточных культур при приготовлении экстракта и дальнейшее его кипячение способствуют более эффективному восстановлению иона-предшественника. Наиболее важным параметром в процессе восстановления оказалось освещение реакционной смеси, поскольку эффективность формирования Au-НЧ в темноте было значительно снижена, а в случае Ag-НЧ – полностью блокирована для большинства условий. Этот результат может указывать на необходимость фотоактивации биомолекул, определяющих восстановительный потенциал каллусов. Вероятнее всего такими молекулами являются низкомолекулярные соединения. Стоит отметить, что микроволновое излучение также оказывало положительный эффект на биосинтез НЧ с точки зрения скорости протекания реакции, тем не менее общая продуктивность процесса при таком способе воздействия была сопоставима с обычными условиями, а в случае синтеза Ag-НЧ даже ниже. Исследование скорости образования Ag-НЧ и Au-НЧ показало, что для полного завершения реакции восстановления требуется 5 часов. В случае синтеза биметаллических НЧ в различных соотношениях было выявлено, что полученные НЧ имели структуру ядро-облочка. Был проведен количественный анализ отдельных фракций биомолекул в экстракте *L. erythrorhizon*, содержание которых убывало в ряду полисахариды, белки, вторичные метаболиты, нуклеиновые кислоты, а также определено влияние отдельных фракций на эффективность продукции НЧ. Показано, что наивысшей способностью к формированию Ag-НЧ обладали фракции полисахаридов и вторичных метаболитов.

Проведенный анализ позволил получить новые данные о восстановительной способности отдельных биомолекул, представленных в экстракте клеточной культуры *L. erythrorhizon*. И хотя абсолютная активность вторичных метаболитов на порядок превышала активность всех других изученных фракций, с учетом их процентного содержания в экстракте воробейника, расчетный вклад полисахаридов в итоговую активность был выше почти в два раза. Поскольку восстановительные способности белков и низкомолекулярных соединений достаточно изучены, мы решили более подробно остановиться на изучении восстановительного потенциала отдельных очищенных растительных полисахаридов. В качестве таких соединений были использованы высокоочищенные и охарактеризованные полисахариды морских водорослей *S. cicharioides* и *F. evanescenes* – фукоидан, ламинаран и альгинат. Поскольку данные классы полисахаридов обладают совершенно разными структурными характеристиками, их свойства, в том числе восстановительные в отношении формирования НЧ металлов, могут значительно различаться. Все изученные полисахариды обладали способностью быстро (в течение нескольких минут) восстанавливать ионы серебра с формированием НЧ. Биосинтетическая способность исследуемых полисахаридов убывала в ряду: альгинат, ламинаран, фукоидан. Размер частиц варьировал в пределах от 45 до 78 нм, величина их дзета-потенциала составляла от -28 до -32 мВ. Таким образом, мы впервые экспериментально показали, что полисахариды бурых водорослей могут быть использованы для быстрого получения Ag-НЧ. Низкую восстановительную активность ламинарана можно объяснить тем, что он является низкомолекулярным и незаряженным полисахаридом. В свою очередь, фукоиданы представлены сульфатированными, фукозосодержащими гетерополимерами средних размеров, в то время как альгинаты относятся к высокомолекулярным карбоксилированным гетерополимерам. Вследствие чего можно сделать вывод, что молекулярная масса и структурные характеристики влияют на восстановительные свойства полисахаридов.

Мы установили, что на продукцию НЧ влияют условия приготовления экстракта и физические параметры реакции. Однако дополнительные воздействия, такие как кипячение или микроволновое излучение, являются энергозатратными, что в свою очередь увеличивает стоимость производства наноструктур. С точки зрения биотехнологии наиболее рентабельным является подход, в котором клетки организма-продуцента обладают повышенными биосинтетическими показателями без применения дополнительных внешних воздействий. В случае с культивируемыми клетками растений, таких результатов можно добиться за счет генно-инженерной регуляции первичного или вторичного метаболизма. Действительно ранее мы показали, что гетерологичная экспрессия гена силикатеина Al морской губки в каллусных клетках табака повышает изначально крайне низкий восстановительный потенциал культуры почти в 4 раза до уровня, сопоставимого с культурой *R. cordifolia*. Мы предположили, что регенерированные из этих каллусов трансгенные растения табака также будут обладать повышенной способностью к формированию НЧ. Однако, экспериментальные данные показали, что растения табака, экспрессирующие ген силикатеина, обладали очень низким восстановительным потенциалом, по сравнению с клеточными культурами и не отличались в этом отношении от контрольных растений. Вероятно, данный феномен связан с различием в процентном соотношении рекомбинантного белка в клетке биообъекта: выше в каллусной культуре и ниже в целом растении.

Поскольку данные, полученные в данной работе, указывают на непосредственное участие вторичных метаболитов в процессе формирования биогенных НЧ, активация их биосинтеза в клеточных культурах потенциально может приводить к увеличению восстановительного потенциала. Для проверки данного предположения, была использована модель клеточной культуры женьшеня – 1с восстановительный потенциал которой в ходе скрининга оказался одним из самых низких. В работе сравнивали активность контрольной клеточной культуры с *rolC*-трансгенной каллусной и корневой культурами. Установлено, что трансгенная корневая линия почти в 3 раза превосходила контрольные и *rolC*-трансгенные каллусные линии по

продукции Ag-НЧ. При этом наблюдалась положительная корреляция с уровнем накопления гинзенозидов в гинзенозидов в клеточных линиях *P. ginseng*. Однако следует признать, что по всей видимости, активация биосинтетического потенциала *rolC*-корней была связана не только с индукцией вторичного метаболизма, т.к. двукратное увеличение содержания гинзенозидов в *rolC*-каллусах не привело к ожидаемой активации восстановительного потенциала. Следовательно, высокая активность корней ассоциирована и с другими изменениями в биохимических процессах трансгенной клетки, имеющих положительное влияние на формирование НЧ. Вероятно, что таким изменением является общая активация биосинтеза белков и полисахаридов, связанная с необходимостью поддержания дифференцированного состояния культуры.

В ходе работы были проведены биоиспытания полученных с помощью клеточных культур биогенных монометаллических и биметаллических НЧ, направленные на выявление перспективных для практического использования цитотоксических, антибактериальных, фунгицидных и элиситорных свойств. Наши результаты показали, что НЧ, полученные с помощью клеточных культур растений, обладают выраженным цитотоксическим действием, но при этом не оказывают существенного влияния на миграцию клеток *in vitro*. Биогенные НЧ проявляли выраженные биоцидные свойства в отношении патогенных бактерий животных и растений. Была обнаружена способность Ag-НЧ активировать биосинтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений, выступая в качестве элиситоров продукции ценных биологически активных веществ. Выявлены фунгицидные свойства биогенных Ag-НЧ в отношении нескольких возбудителей фузариоза пшеницы, включая *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* и *F. sporotrichioides*. В совокупности, полученные нами данные, создают предпосылки для продолжения исследований свойств биогенных НЧ металлов, представляющих интерес для медицины в качестве кандидатов для биосовместимых антисептических и противоопухолевых терапевтических препаратов. Данные частицы представляют интерес и для биотехнологии с целью их использования в качестве обеззараживающих средств и элиситоров вторичного метаболизма широкого спектра действия.

Таким образом, мы показали, что клеточные культуры являются перспективным альтернативным источником биомолекул с высоким потенциалом в отношении биосинтеза НЧ металлов. Продукция НЧ с использованием экстракта клеточной культуры воробейника значительно превышает многие описанные в литературе методы и может быть использована в бионанотехнологии. Отличительной особенностью описанного биологического подхода является возможность использования для синтеза НЧ побочных продуктов биотехнологического производства, например, клеточного дебриса после экстракции целевого продукта, отдельных примесных фракций, образующихся при технологическом процессе или компонентов отработанных питательных сред. Нами впервые показана возможность увеличения эффективности фитосинтеза и изменения их физико-химических и биологических свойств с помощью методов генетической инженерии.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт каллусной культуры *L. erythrorhizon* с высокой эффективностью индуцирует процесс экзогенного формирования отрицательно заряженных монометаллических и биметаллических Ag/Au-НЧ. Наиболее важным фактором для данного процесса является освещение реакционной смеси.

2. На примере каллусной культуры воробейника впервые экспериментально показано, что отдельные фракции экстракта вносят различный вклад в эффективность формирования НЧ. Восстановительный потенциал биомолекул увеличивается в ряду: нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и вторичные метаболиты – производные кофейной кислоты.

3. Высокоочищенные индивидуальные полисахариды морских водорослей *S. cicharioides* и *F. evanescens*, такие как фукоидан, ламинаран и альгинат, проявляют способность к

синтезу монодисперсных Ag-НЧ с высокой биологической активностью. Восстановительный потенциал альгината превосходил другие изученные полисахариды более чем в 3 раза.

4. Сверхэкспрессия гена силикатеина значительно повышает восстановительный потенциал каллусных культур в отношении биосинтеза Ag-НЧ, однако эта особенность отсутствует у трансгенных растений. Установлено, что полученные НЧ, способны эффективно подавлять рост бактериальных патогенов животных и растений *E. coli* и *A. tumefaciens*.

5. Активация биосинтеза гинзенозидов в *rolC*-трансгенных корневых культурах женьшеня способствует пропорциональному увеличению продукции Ag-НЧ, что подтверждает участие вторичных метаболитов в их биосинтезе.

6. НЧ, полученные с помощью клеточных культур растений обладают выраженным цитотоксическим действием в отношении клеток глиомы С6 крысы, нейробластомы N2A и эмбриональных фибробластов 3Т3 мыши. Наибольшая степень цитотоксичности отмечена для серебряных монометаллических частиц, а также для биметаллических частиц с большей пропорцией атомов серебра.

7. Ag-НЧ и нитрат серебра значительно активируют накопление вторичных метаболитов в каллусных культурах *C. cardunculus*, *V. vinifera* и *A. thaliana*. При этом эффект данных элиситоров варьировал для разных групп вторичных метаболитов и был равным в случае кафеилхинных кислот и стильбенов, тогда как НЧ оказались более эффективны для стимуляции накопления индольных глюкозинолатов.

8. Ag-НЧ биогенного происхождения ингибировали рост различных видов патогенных грибов-возбудителей фузариоза пшеницы. На основе полученных данных нами разработан способ стерилизации естественно инфицированных семян пшеницы, при котором поверхностная обработка семян раствором Ag-НЧ, в течение 20 часов приводит к полной элиминации инфекции, не оказывая влияния на всхожесть семян и жизнеспособность растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Shkryl Y., Veremeichik G., Kamenev D., Gorpenchenko T., **Yugay Y.**, Mashtalyar D., Nepomnyaschiy A., Avramenko T., Karabtsov A., Ivanov V., Bulgakov V., Gnedenkov S., Kulchin Y., Zhuravlev Y. Green synthesis of silver nanoparticles using transgenic *Nicotiana tabacum* callus culture expressing silicatein gene from marine sponge *Lantrunculia oparinae* // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2018. – V. 46. – P. 1646–1658.

2. **Yugay Y.A.**, Usoltseva R.V., Silant'ev V.E., Egorova A.E., Karabtsov A.A., Kumeiko V.V., Ermakova S.P., Bulgakov V.P., Shkryl Y.N. Synthesis of bioactive silver nanoparticles using alginate, fucoidan and laminaran from brown algae as a reducing and stabilizing agent // Carbohydrate Polymers. – 2020. – V. 245. – P. 116547.

3. Shkryl Y., Rusapetova T., **Yugay Y.**, Egorova A., Silant'ev V., Grigorchuk V., Karabtsov A., Timofeeva Y., Vasyutkina E., Kudinova O., Ivanov V., Kumeiko V., Bulgakov V. Biosynthesis and cytotoxic properties of Ag, Au, and bimetallic nanoparticles synthesized using *Lithospermum erythrorhizon* callus culture extract // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – P. 9305.

4. **Yugay Y.**, Rusapetova T., Mashtalyar D., Grigorchuk V., Vasyutkina E., Kudinova O., Zenkina K., Trifuntova I., Karabtsov A., Ivanov V., Aseeva T., Bulgakov V., Shkryl Y. Biomimetic synthesis of functional silver nanoparticles using hairy roots of *Panax ginseng* for wheat pathogenic fungi treatment // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2021. – V. 207. – P. 112031.

Работы, опубликованные в материалах региональных и международных научных конференциях:

5. Авраменко Т.В., Шкрыль Ю.Н., Горпенченко Т.Ю., Югай Ю.А. Использование наночастиц серебра для защиты клеточных культур растений от бактериальной контаминации // XV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, г. Владивосток, 5–15 сентября 2014 г.: Тезисы докладов, с. 3.

6. Югай Ю.А., Авраменко Т.В., Шкрыль Ю.Н. Антибактериальный эффект наночастиц серебра в культурах клеток растений // Тезисы докладов VI международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», г. Ростов-на-Дону, 1–3 октября 2015 г., с. 211.

7. Югай Ю.А., Григорчук В.П., Шкрыль Ю.Н. Влияние наночастиц серебра на биосинтез вторичных соединений в клеточной культуре *Arabidopsis thaliana* и *Cynara cardunculus* // Тезисы докладов региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам, г. Владивосток, 11–30 апреля 2017 г., с. 248.

8. Yugay Yu., Usoltseva R., Ermakova S., Shkryl Yu. Biosynthesis of silver nanoparticles using algal polysaccharides and its biocidal activity // Future of biomedicine 2019 (FOB 2019): International scientific conference, Vladivostok, Russia, September 17–26, 2019. P. 80.

ЮГАЙ
ЮЛИЯ АНАТОЛИЕВНА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ**