

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных, ЛНБ ИБФРМ РАН

***Dunaliella salina* как продуцент физиологически активных веществ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 243 группы
Направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Лехмана Ильи Петровича

Научный руководитель

профессор, д.б.н.

В. А. Богатырев

(подпись, дата)

Зав. кафедрой человека и животных,

доцент, д.б.н.

О. В. Семячкина - Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Рак является одной из наиболее распространенных причин смерти во всем мире. Несмотря на значительные достижения в области онкологии, поиск новых и более эффективных методов лечения рака остается одной из наиболее актуальных задач медицинской науки.

Инновационным направлением в лечении рака является фотодинамическая терапия, которая представляет собой метод лечения, основанный на использовании фотосенсибилизаторов. Одним из перспективных источников новых фотосенсибилизаторов являются микроводоросли. Среди микроводорослей особое внимание исследователей привлекает *Dunaliella salina* – галофильная микроводоросль, способная накапливать большие количества бета-каротина и других пигментов.

В связи с этим, целью данного исследования является изучение потенциала использования *D. salina* в качестве производителя фотосенсибилизаторов хлоринового ряда для фотодинамической терапии.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить биологические особенности *D. salina* и ее потенциал для биотехнологии.
2. Оптимизировать условия культивирования микроводорослей для получения фотосенсибилизаторов хлоринового ряда.
3. Провести оценку антиоксидантной активности комплексов экстрактов *D. salina* с коллоидным золотом.
4. Исследовать антиоксидантную активность полученных экстрактов и их влияние на окислительный метаболизм.
5. Анализировать эффективность фотосенсибилизаторов в условиях *in vitro*.

Основная часть

D. salina является перспективным объектом для биотехнологии благодаря своей способности накапливать ценные биологически активные вещества. Одним из наиболее важных продуктов, синтезируемых микроводорослью является бета-каротин – природный пигмент, обладающий антиоксидантными свойствами и используемый в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

В настоящее время *D. salina* используется в промышленном масштабе для производства β -каротина и других пигментов. Оптимизация условий культивирования позволяет увеличить содержание целевых продуктов в биомассе клеток и повысить эффективность ее использования в биотехнологии.

D. salina также является перспективным источником фотосенсибилизаторов хлоринового ряда для фотодинамической терапии. Хлорофиллы - основные пигменты, участвующие в фотосинтезе, обладают способностью генерировать активные формы кислорода под действием света. Этот эффект используется в фотодинамической терапии для повреждения опухолевых клеток и их гибели.

Механизм возбуждения фотосенсибилизатора под действием света в фотодинамической терапии заключается в поглощении фотонов света молекулами фотосенсибилизатора, что приводит к переходу электронов на более высокий энергетический уровень. Возбужденная молекула фотосенсибилизатора может передавать энергию на окружающие молекулы, такие как кислород, что приводит к образованию активных форм кислорода

Синглетный кислород является высокореактивной формой кислорода, способной окислять биологические молекулы, такие как липиды, белки и нуклеиновые кислоты, что приводит к повреждению и гибели клеток опухоли.

Материалы и методы исследования

Материалы исследования

В данной работе используются следующие материалы:

- Культура водоросли *D. salina* Teod. IP-PASD-294, полученная из коллекции института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН;
- Оптимальная среда для выращивания водорослей;
- Реактивы для синтеза 15 нм коллоидного золота по методу Френса: 1% раствор HAuCl_4 , 1% раствор цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$).
- Суспензия человеческих эритроцитов в физрастворе для оценки антиоксидантной активности пигментов *in vitro*.
- Реактивы для определения антиоксидантной активности: DPPH (Sigma), фосфатно-солевой раствор (PBS).
- Реактивы для синтеза медного комплекса хлорофилла: 96% раствор этанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), пищевая сода (NaHCO_3), 70% раствор уксусной кислоты (CH_3COOH), медный купорос (CuSO_4).

Методы исследования

Нормальный рост клеточной культуры обеспечивался концентрацией NaCl 1,5 М и освещенностью в 650 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Для создания условий каротиногенеза концентрацию NaCl увеличивали до 3 М, освещенность до 6500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

Культивирование проводили в 6-, 12- и 96-луночных планшетах. При посеве и через каждые сутки проводили спектрофотометрические измерения на спектрофотометрическом ридере BioTek в режиме регистрации спектров экстинкции 400–800 нм с шагом 4 нм.

Для определения содержания пигментов в клеточных суспензиях добавляли 96%-раствор этанола. Далее перемешивали пипетированием и выдерживали в ультразвуковой ванне и центрифугировали. Далее регистрировали поглощение на планшетном ридере на длинах волн 470, 649 и 665 нм.

Для проведения цифрового анализа изображений, использовались снимки, полученные с помощью камеры смартфона на базе Android с использованием программы "Frainelaps".

Для оценки про- и антиоксидантных свойств препаратов *D. salina* и их комплексов с золотыми наночастицами (ЗНЧ) было использовано стандартное цитратное КЗ-15, получаемое по методу Френса.

Метод анализа антиоксидантной активности (АОА) основан на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного с суспензией пигментов в этаноле и ДМСО. Величина окислительных свойств радикалов препарата оценивалась по показателю коэффициента экстинкции при длине волны 514 нм на спектрофотометрическом ридере.

Для оценки физиологической активности экстрактов использовали модель гемолизирующих эритроцитов. Для этого измеряли способность эритроцитов сопротивляться осмотическому гемолизу за счет стабилизации их мембран исследуемыми экстрактами. Мембраностабилизирующую активность экстрактов оценивали на модели осмотического гемолиза с использованием 1%-ной суспензии эритроцитов донорской крови.

Результаты и обсуждение

Анализ роста и содержания растительных пигментов

На начальном этапе проводимых исследований были разработаны методические подходы к анализу роста клеточных культур и содержания растительных пигментов в них. Кроме того, была выдвинута гипотеза о том, что логарифм цветности может зависеть от концентрации пигментов, и были проверены ее обоснования.

Для проверки выдвинутого предположения о линейной зависимости цветности *D. salina* от ее концентрации была проведена оценка изменений каждого канала цветности в ряду последовательных разведений суспензии. Сравнение полученных результатов показало, что точность линейной аппроксимации цветометрических показателей даже превосходит спектрофотометрические (коэффициент Пирсона R^2 составил 0,99 и 0,97 соответственно).

Для уточнения достоверности оценки была использована общепринятая стандартная методика определения содержания основных растительных пигментов: хлорофиллов а, б и каротиноидов в спиртовых экстрактах по разработанной нами упрощенной процедуре. Упрощенная методика позволяет проводить измерения одновременно в нескольких планшетах, при этом общее время анализа занимает не более 1 часа. Корректность измерений подтверждается сохранением соотношения пигментов при разведении. Отношение каротиноидов к общему хлорофиллу постепенно изменяется в процессе роста культуры и особенно заметно при переводе культуры в условия усиленного каратиногенеза.

Результаты колориметрических и спектроскопических измерений суммированы в таблице 1.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что все три использованных метода оценки содержания основных растительных пигментов дают схожие результаты. В частности, все они показывают, что

содержание каротиноидов примерно в два раза превышает содержание общего хлорофилла.

Таблица 1 – Колориметрические и спектроскопические параметры суспензий микроводоросли *D. salina*, культивируемой в различных условиях

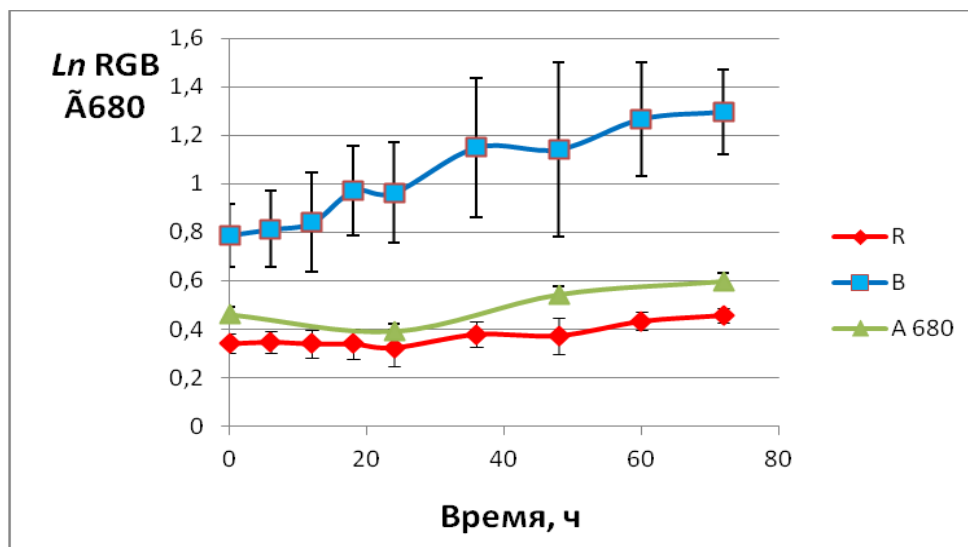
Условия культивирования	Нормальный рост	Каратиногенез
A680	0,26±0,010	0,47±0,003
680/470	1,11±0,047	0,61±0,001
Общий хлорофилл	2,45±0,091	1,79±0,046
Хлорофилл/ Каратиноиды	4,62±0,064	1,90±0,023
RGB Синий канал	1,39±0,268	2,06±0,304
RGB Отношение синий/красный	5,45	9,88

На рис. 4 приведен пример построения кривых по данным цифрового анализа изображений (R, B) и спектрофотометрии (A 680).

Анализ данных показывает, что коэффициент корреляции для массивов $\tilde{A}680$ и $\ln R$ (красного канала) составляет 0.92, а для $\tilde{A}680$ и $\ln B$ – 0.80. Это объясняется тем, что хлорофиллы имеют два основных максимума поглощения в красной и синей областях спектра видимого диапазона, в то время как каротиноиды – только в синей.

На основе полученных результатов был сделан вывод, что использование аддитивной цветовой модели RGB и оценка изменения каналов цветности в ряду последовательных разведений суспензии *D. salina* показали высокую достоверность линейной аппроксимации цветометрических показателей, превосходящую спектроскопические результаты. Применение упрощенной методики определения содержания

основных растительных пигментов (хлорофиллов а, б и каротиноидов) в спиртовых экстрактах также подтвердило корректность измерений и позволило выявить изменения в соотношении пигментов при росте культуры и переводе в условия усиленного каротиногенеза.



R – ромбы; B – квадраты; $\tilde{A}680$ – треугольники.

Рисунок 1 – Кривые роста культуры *D. salina* по данным цифрового анализа изображений и спектрофотометрии.

В результате было установлено, что логарифм цветности *D. salina* действительно линейно зависит от ее концентрации. Этот результат может быть использован для оценки концентрации физиологически активных веществ, производимых микроводорослью, на основе измерений ее цветности.

Таким образом, анализ цветности микроводоросли позволяет получить важную информацию о ее физиологическом состоянии и концентрации продуцируемых ею веществ, и может быть использован для мониторинга и оптимизации процессов ее культивирования.

Оценка про- и антиоксидантной активности экстрактов на основе колориметрии свободных радикалов

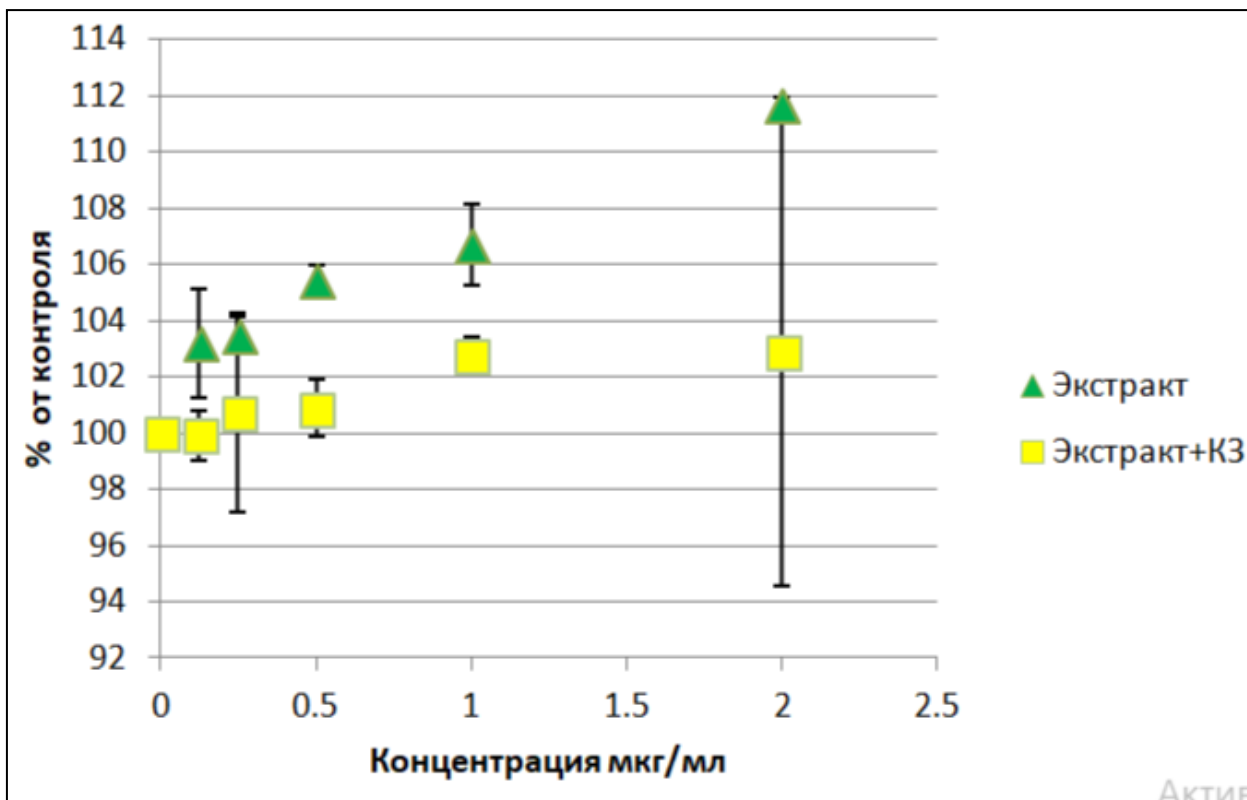
На втором этапе исследований была проведена оценка антиоксидантной активности комплекса экстрактов *D. salina* с коллоидным золотом. Это взаимодействие представляет особый интерес, поскольку известно, что наиболее частым и ранним проявлением токсичности наночастиц на клетки является образование активных форм кислорода. В свою очередь, растительные пигменты, такие как каротиноиды, являются природными антиоксидантами, способными связывать содержащие неспаренные электроны частицы с образованием менее активных или вовсе неактивных радикалов АФК.

Таким образом, целью данного этапа являлась оценка способности металлических наночастиц (на примере КЗ-15) в комплексе с растительными экстрактами модулировать окислительный метаболизм вследствие про- и антиоксидантной активности. Для достижения этой цели была исследована антиоксидантная активность комплекса в различных концентрациях.

Результаты, полученные в ходе данного этапа, показали, что экстракты *D. salina* обладают выраженными прооксидантными свойствами. К тому же, этот эффект увеличивается вместе ростом концентрации препарата. Так, при концентрации 0,125 мкг/мкл экстракта прооксидантная активность возрастает на 3,1 % по отношению контролю, а при 2 мкг/мкл – на 11,5%. Помимо этого, было выяснено, что коллоидное золото вызывает обратный эффект, т.е. способен эффективно снижать уровень АФК в клетках, обработанных наночастицами.

Так, рисунок 5 показывает, что добавление КЗ-15 к растворам экстрактов нивелирует прооксидантное действие последних, в то время как цитратное золото в чистом виде показывает сильную прооксидантную активность. Вдобавок, при добавлении 10 мкл КЗ-15 к 200 мкл DPPH увеличивает интенсивность поглощения на 8 %, а 20 мкл – на 25 %. Это свидетельствует о том, что данный комплекс может быть использован для

защиты клеток от окислительного стресса, вызванного наночастицами, и может иметь потенциальное применение в медицине и биотехнологии.



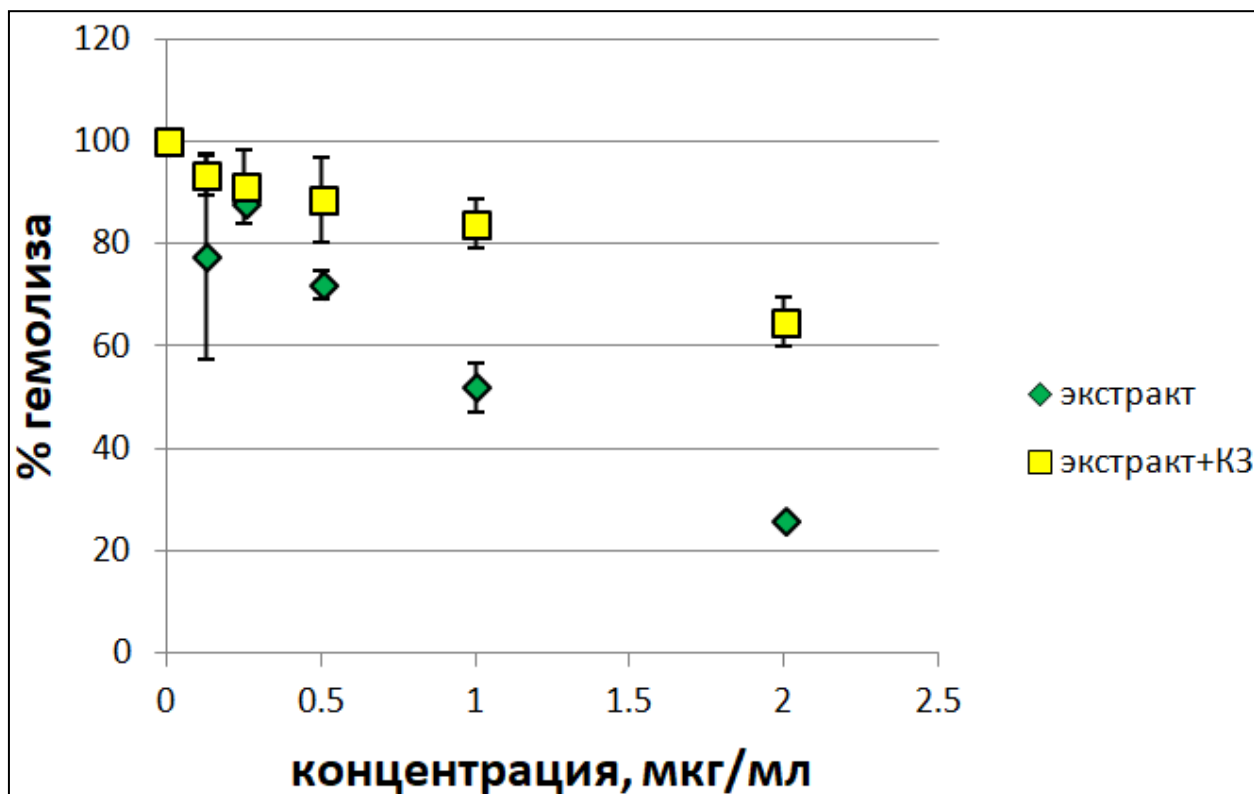
Треугольники – спиртовой экстракт микроводорослей; квадраты – комплекс экстракта с коллоидным золотом.

Рисунок 2 – DPPH-анализ препаратов экстракта *D. salina* и его комплекса с золотыми наночастицами.

В целом, данные, собранные на этом этапе, представляют собой значительный прогресс в изучении взаимодействия между наночастицами и растительными экстрактами. Эти результаты могут служить основой для дальнейших исследований в этой области, включающих в себя изучение механизмов антиоксидантного действия КЗ-15 и оптимизацию состава и дозировки комплекса препарата с золотыми наночастицами для различных применений.

Оценка физиологической активности экстрактов на модели гемолизирующих эритроцитов

В третьем этапе исследований проводилось изучение антиоксидантных свойств экстрактов *D. salina*, используя модель гемолиза эритроцитов. Эта модель, основанная на анализе повреждения эритроцитов, вызванного окислительным стрессом, является стандартным методом для оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ.



Ромбы – спиртовой экстракт микроводорослей; квадраты – комплекс экстракта с золотыми наночастицами.

Рисунок 3 – Изучение антиоксидантных свойств экстракта *D. salina* и его комплекса с золотыми наночастицами на модели осмотического гемолиза эритроцитов.

Исследование, представленное на рисунке 6, демонстрирует, что спиртовой экстракт микроводорослей проявляет выраженную зависимость от концентрации в отношении стабилизации эритроцитарных мембран в тесте осмотического гемолиза. Введение коллоидного золота в состав экстракта

приводит к снижению эффективности стабилизации мембран эритроцитов. Более того, при концентрации экстракта, соответствующей 2 мкг/мл каротиноидов и 0,58 мкг/мл золота, наблюдается частичное разрушение (около 25%) эритроцитов в условиях нормального осмотического давления.

Эти данные указывают на потенциальное применение спиртового экстракта микроводорослей для укрепления клеточных мембран и предотвращения гемолиза. Однако добавление коллоидного золота к экстракту не оказывает положительного влияния и может даже вызывать негативные эффекты.

Синтез медного комплекса хлорофилла

В ходе проведенных исследований был успешно получен медный комплекс хлорофилла. Для подтверждения его структуры были проведены спектральные исследования, которые показали, что полученные спектры сходятся с данными научной литературы.

Однако, вследствие низкого количества полученного вещества, не удалось проверить его прооксидантную активность *in vitro* и *in vivo*. Это ограничивает наши возможности для полного понимания свойств и потенциального применения медного комплекса хлорофилла.

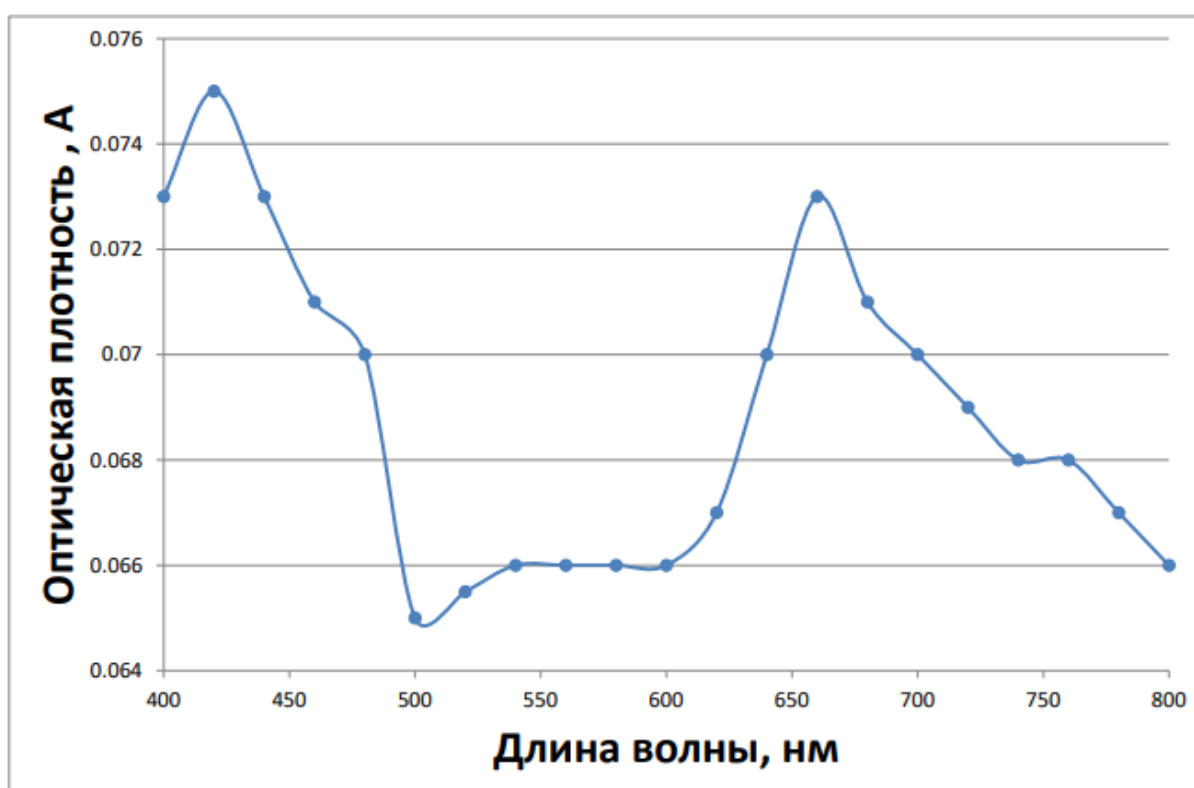


Рисунок 4 – Спектры поглощения полученного соединения с максимумами в синей и красной области спектра.

Несмотря на это, получение медного комплекса хлорофилла является важным шагом в изучении свойств хлорофилла и его производных соединений. Этот результат может быть использован в дальнейших исследованиях для расширения наших знаний о потенциальном применении хлорофилла и его производных соединений в медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что микроводоросль *D. salina* является перспективным источником фотосенсибилизаторов хлоринового ряда, которые могут быть эффективно использованы в фотодинамической терапии рака. Оптимизация условий культивирования и использование комплексов экстрактов с наночастицами открывают новые возможности для повышения эффективности лечения. Будущие исследования будут направлены на расширение знаний о свойствах и применении фотосенсибилизаторов, а также на оценку их эффективности в условиях клинических испытаний.

1. *D. salina* обладает значительным потенциалом для использования в биотехнологии благодаря способности синтезировать биологически активные вещества, включая фотосенсибилизаторы хлоринового ряда.

2. Оптимизация условий культивирования позволила увеличить выход целевых продуктов и улучшить эффективность производства биологически активных веществ, что подтверждает возможность их промышленного получения.

3. Комплексы экстрактов *D. salina* с коллоидным золотом продемонстрировали выраженные антиоксидантные свойства, что важно для модуляции окислительного метаболизма.

4. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности фотосенсибилизаторов на основе *D. salina* при их использовании в условиях *in vitro*, что открывает перспективы для дальнейших исследований и применения в клинической практике.