

БИОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ПЛЮМБАГИНОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНДОФИТНОГО ГРИБА *Fusarium solani*, ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2018г. Т.Дж. Салес, П.П. Кларанс, Л.Дж. Лалитха, П. Агастиан

Отдел этнофармакологии и микробиологической биотехнологии, Отдел биологии растений
и биотехнологии Колледжа Лойола, Ченнай 600034, Тамил Наду, Индия

E-mail: agastian@loyolacollege.edu

Поступила в редакцию 17.01.18 г.

Среди наиболее обнадеживающих биоматериалов, предоставляющих новые возможности для борьбы с различными раковыми и инфекционными заболеваниями, выделяются металлические наночастицы с антибактериальными и противораковыми свойствами. Целью настоящего исследования был биосинтез наночастиц серебра с плюмбагином (5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтохиноном) с использованием эндофитных грибов *Fusarium solani*. Грибы идентифицировали в соответствии с морфологическими характеристиками и анализом последовательности ITS в ядерной рибосомальной ДНК. Синтезированные наночастицы были первоначально выявлены визуально по изменению цвета от желтого до красновато-коричневого. Их синтез дополнительно подтвержден с помощью ультрафиолетовой спектроскопии по полосе поверхностного плазмонного резонанса при 450 нм. Анализ методом ИК-Фурье-спектроскопии выявил амины и амиды, отвечающие за стабилизацию полученных наночастиц. Методом сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения показано, что наночастицы хорошо диспергированы, имеют форму, близкую к сферической, и размеры в районе $23,2 \times 33,2 \times 33,7$ нм. С помощью рентгеновской дифракции была показана их кристаллическая природа. Синтезированные наночастицы серебра с плюмбагином продемонстрировали хорошую дозозависимую антибактериальную активность. У них наблюдали также дозозависимую цитотоксичность к клеткам рака молочной железы человека MCF-7, было установлено, что ингибирующая концентрация IC_{50} составляет 14,5 мкг/мл. Противораковая активность также осуществлялась путем ингибирования клеток на фазе синтеза ДНК.

Ключевые слова: *Plumbago rosea*, *Fusarium solani*, AgNP, антибактериальная активность, испытание цитотоксичности.

DOI: 10.1134/S0006302918050137

Рак молочной железы является одним из самых смертельных заболеваний в мире, и число новых случаев увеличивается с каждым годом. Разработка противораковых препаратов в отношении рака молочной железы человека играет важную роль, так как это одна из опасных для жизни болезней. Среди различных раковых заболеваний человека рак молочной железы лидирует по количеству случаев первичной ма-

лигнизации опухоли молочной железы, в том числе 500000 человек пострадали в Азии. Некоторые из доступных в настоящее время препаратов для лечения рака проявляют токсичность, оказывая влияние как на раковые, так и на нормальные клетки, что требует поиска новых, эффективных и нетоксичных противораковых соединений из природных источников. Поэтому поиск более эффективных противоопухолевых препаратов для лечения рака молочной железы остается актуальной областью исследований. За последнее десятилетие многие исследователи переключили свое внимание на наночастицы, в том числе наночастицы металлов, из-за их контролируемых размеров и формы, легкого синтеза, выраженных оптических свойств [1].

Сокращения: P-AgNP – наночастицы серебра с плюмбагином, СЭМ – сканирующая электронная микроскопия, УФ – ультрафиолетовый, НЕК – клеточная линия эмбриональных почек человека (от англ. Human Embryonic Kidney), МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, АО – акридиновый оранжевый, EtBr – этидия бромид, PBS – натрий-фосфатный буфер, DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндолил.

Металлические наночастицы находятся в приоритете практически во всех отраслях науки, включая физику, химию, информатику, биологию и биомедицину [2]. Наиболее важным и отличительным свойством наночастиц является то, что они обладают большим отношением площади поверхности к объему и совершенно новыми или улучшенными свойствами, основанными на конкретных характеристиках, таких как размер, распределение и морфология.

Наночастицы серебра, один из традиционных фотосенсибилизирующих агентов, в настоящее время используются для различных приложений – в электронике [3], катализе [4], медицинской диагностике [5]. Наночастицы коллоидного серебра обладают выраженным бактерицидным действием. В последнее время все более широкое распространение наночастицы серебра получают в области онкологии благодаря обнаружению их противоопухолевой активности.

Методы получения наночастиц можно было разделить на две большие группы: дисперсионные методы, или методы получения наночастиц путем измельчения обычного макрообразца (конденсация при сверхнизких температурах, варианты химического, фотохимического и радиационного восстановления, лазерное испарение), и конденсационные методы, или методы получения наночастиц из отдельных атомов (варианты механохимического дробления, конденсация из газовой фазы, плазмохимические методы и др.).

В последние годы возрос интерес к биосинтезу наночастиц серебра. Новым проектом в области нанобиотехнологии недавно стал опосредованный микроскопическими грибами синтез наночастиц серебра, для чего были успешно использованы многие грибы, такие как *Fusarium acuminatum* [6–11] и др. Исследования подтвердили, что среди различных биологических агентов грибы являются наиболее эффективными кандидатами на производство металлических наночастиц как внутри, так и вне клеток. Синтез наночастиц биологическим путем прост, быстр и экономичен, а полученные таким образом наночастицы нетоксичны, чисты и биосовместимы.

Апоптоз – это высокорегулируемый запрограммированный процесс гибели клеток, который устраняет дисфункциональные клетки организма путем самодеградации [12]. Апоптоз может быть вызван в клетке через внешний или внутренний путь. Внешний путь инициируется посредством стимуляции трансмембранных рецепторов клеточной гибели, таких как рецепторы Fas, расположенные на клеточной

мембране [13]. Напротив, собственный путь апоптоза управляется митохондриальным сигнальным каскадом, посредством высвобождения сигнальных факторов смерти, и эти два апоптотических пути выполняются в основном классом цистеиновых протеаз, известных как каспазы [14].

Эндофитные грибы – это многообещающая группа грибковых видов, которые колонизируют живые и здоровые ткани растений, не вызывая каких-либо видимых симптомов заболевания. Эндофитные грибы производят природные биологически активные соединения, которые считаются альтернативными источниками биологически активных соединений растений; биологически активные соединения из эндофитных грибов обладают противомикробным действием [15] и противораковой активностью [16]. В этом исследовании мы сосредоточились на биосинтезе наночастиц серебра с плюмбагином (5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтохиноном) (P-AgNP) с использованием неочищенного экстракта эндофитного гриба *Fusarium solani*, выделенного из вымирающего лекарственного растения *Plumbago rosea*. Синтезированные P-AgNP дополнительно характеризовались с помощью методов ультрафиолетовой спектроскопии, инфракрасной Фурье-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), рентгеновской дифракции, дополнительными цитотоксическими анализами *in vitro* в линии клеток рака молочной железы человека MCF-7, а также исследованиями противоопухолевой активности наночастиц *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источник эндофитных грибов. Растительный материал *Plumbago rosea*, собранный в районе Коллам (штат Керала, Индия), был таксономически идентифицирован и аутентифицирован в Исследовательском институте леса Кералы (Пичи, штат Керала, Индия). Образец растения промывали в водопроводной воде для удаления пыли и мусора, а затем разрезали на мелкие кусочки стерильным лезвием в асептических условиях. Образец растения промывали 0,1%-м полисорбатом твин 20 в течение 20–30 с, затем образец обрабатывали 0,1%-м раствором бавистина в течение двух–трех минут. Каждый образец снова подвергали поверхностной стерилизации 70%-м этанолом в течение одной минуты, а части растений погружали в раствор 1%-го раствора гипохлорида натрия на время от 30 с до 1 мин. Образцы промывали в стерильной дистиллированной воде в течение одной минуты, а затем оставляли сушить на

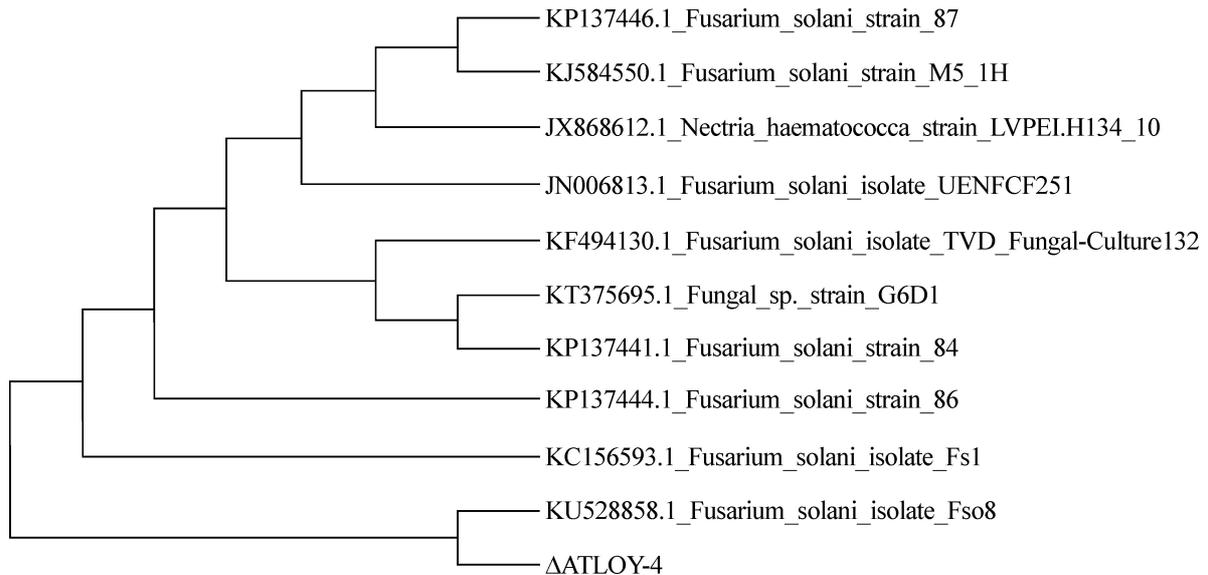


Рис. 1. Дерево, построенное методом «присоединения соседей» и показывающее взаимоотношения *Fusarium solani* штамма ATLOY 4 среди рода *Fusarium* на основе последовательностей генов 18S рРНК.

фильтровальной бумаге в камере Laminar Air [17].

Изолирование эндофитных грибов. Поверхностно стерилизованные образцы расщепляли на кусочки 1,0 см для обнажения коры и пучков. Затем их асептически переносили в петриды, содержащие картофельный декстрозный агар и водный агар, для выделения эндофитных грибов. Для подавления роста бактерий добавляли стрептомицин (250 мг/л). Затем чашки инкубировали при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение максимум пяти суток. Грибы, растущие на среде, изолировали, пересеивали и идентифицировали.

Идентификация эндофитных грибов. Выделение ДНК. Для извлечения геномной ДНК 50 мг грибкового мицелия замораживали в жидком азоте и механически разрушали. Экстракцию геномной ДНК проводили с использованием набора NIMEDIA (Индия) в соответствии с инструкциями производителя.

ПЦР-амплификация и секвенирование гена 18S рРНК. Геномную ДНК грибкового штамма ATLOY 4 экстрагировали с использованием метода СТАВ [18]. ITS-домен рДНК амплифицировали с помощью универсальных праймеров ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACSTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCSTCCGCTTATTTGATATGC-3'), как описано в работе [19]. Реакции ПЦР были стандартизованы с помощью исходной денатурации при 94°C в течение 4 мин с последующим 32-мя циклами по 4 мин при 94°C , 50°C в течение 1 мин, 72°C в течение 2 мин и окончательным удлинением при 72°C в течение 8–10 мин. Реакцию прекра-

щали при 4°C в течение 1 ч. Продукты ПЦР хранили при 4°C и визуализировали гель-электрофорезом. Полученный амплифицированный продукт очищали и секвенировали праймерами, а полученные последовательности загружали в Генбанк для поиска гомологии с помощью Blast. Филогенетические отношения оценивали с использованием программы MEGA версии 6.0. Филогенетическое дерево (рис. 1) было построено с использованием метода «присоединения соседей».

Биосинтез наночастиц серебра с плумбагином. Выделенные эндофитные грибы инокулировали в солодовом глюкозовом дрожжевом пептонном бульоне, содержащем дрожжевой солодовый экстракты по 0,3% каждый, 1% глюкозы, 0,5% пептона при 28°C в статическом состоянии. Через 72 ч инкубированную биомассу фильтровали и промывали водой для удаления компонентов среды. Биомассу полностью промывали, помещали в колбы, содержащие 100 мл дистиллированной воды, и инкубировали в течение 48 ч. Биомассу фильтровали с помощью фильтровальной бумаги Ватман №1, фильтрат сохраняли. К фильтрату грибов добавляли 1 мМ нитрата серебра и инкубировали при комнатной температуре в темноте. Параллельно также выполняли контрольную пробу, содержащую бесклеточный фильтрат без раствора нитрата серебра [20].

Определение параметров наночастиц серебра с плумбагином. Ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия. Формирование Р-AgNP подтверждалось изменением цвета белого фильтрата с бе-

лым мицелием на красновато-коричневый, визуально наблюдаемый в течение определенного периода времени, что указывает на биологическое восстановление ионов серебра до наночастиц серебра. P-AgNP, образованные в грибковом фильтрате, свободном от мицелия, контролировали измерением поглощения на спектрофотометре в ультрафиолетовом диапазоне.

Сканирующая электронная микроскопия. Метод СЭМ использовали для анализа формы и размера синтезированных P-AgNP. Для анализа готовили тонкие пленки образца на медной сетке с углеродным покрытием. Морфологию и размер наночастиц изучали на микроскопе Hitachi S-4500 (Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Изображения наночастиц серебра также получали на сканирующем электронном микроскопе VEGA 3 (TESCAN, Чехия).

Анализ методом инфракрасной Фурье-спектроскопии. Раствор с синтезированными P-AgNP центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин, затем гранулы ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде и снова центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Очищенные наночастицы серебра высушивали при комнатной температуре. Для анализа методом инфракрасной Фурье-спектроскопии порошкообразные P-AgNP таблетировали с KBr. Спектр показал биомолекулы, участвующие в синтезе и стабилизации P-AgNP.

Рентгенодифракционный анализ. Синтезированные P-AgNP подвергали рентгенодифракционному анализу. Измерения были выполнены на установке REGAKU mini flex 600 (CLRI, Chennai) с использованием излучения Cu-K α ($\lambda = 1,54$ нм) в диапазоне 2θ , равном 30–80, при ускоряющем напряжении 40 кВ и токе 30 мА.

Антибактериальная активность биосинтезированных наночастиц серебра с плюмбагином. Для определения антибактериальной активности наночастиц серебра методом дисковой диффузии [21–23] использовали следующие тестовые организмы: грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-1706, *Enterobacteria erogenes*, *Proteus vulgaris* 1717, *Salmonella typhimurium* 1251, *Vibrio parahaemolyticus* 451, *Yersinia enterocolitica* 840 и грамположительные бактерии: *Micrococcus luteus* 106, *Staphylococcus aureus* 96. Использовали свежеприготовленную бактериальную культуру. 20 мл агара Mullar Hinton (Hi-media, Мумбаи) выливали в стерильные планшеты и оставляли до затвердевания. Испытуемые организмы (100 мкл суспензии, содержащей 10⁸ КОЕ/мл бактерий) наносили на верхнюю часть отвер-

жденного агара и давали высохнуть в течение 10 мин. Испытания проводили при двух разных концентрациях наночастиц серебра (0,5 и 1 мг/мл). Загруженные диски оставляли на 30 мин при комнатной температуре для диффузии компонентов. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Зону ингибирования регистрировали в миллиметрах, эксперимент повторяли трижды.

Противораковая активность. *Культура клеток.* Клетки аденокарциномы молочной железы (MCF-7) и эмбриональных почек (HEK) человека были закуплены в Национальном центре наук о клетке (Пуна, Индия). Раковые клетки поддерживали в среде Игла в модификации Дульбекко, дополненной L-глутамином (2 мМ) и сбалансированным солевым раствором, содержащим 1,5 г/л Na₂CO₃, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ 1-глутамин, 1,5 г/л глюкозы, 10 мМ HEPES и 10% фетальной бычьей сыворотки (GIBCO, США). Пенициллин и стрептомицин (100 МЕ/100 мкг) были доведены до 1 мл/л. Клетки выдерживали при 37°C с 5% CO₂ в увлажненном CO₂-инкубаторе.

Оценка цитотоксичности. Значение ингибирующей концентрации (IC₅₀) оценивали с использованием МТТ-анализа (оценки жизнеспособности клеток с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ), основанной на определении активности дегидрогеназы митохондрий). Раковые клетки выращивали в 96-луночном планшете (1·10⁴ клеток на лунку) в течение 48 ч до достижения 80%-й заселенности. Среду инкубирования заменяли на свежую, содержащую последовательно разбавленные синтезированные соединения, и клетки дополнительно инкубировали в течение 48 ч. Культуральную среду удаляли, в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора МТТ (Hi-Media, Индия) и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. После удаления надосадочной жидкости в каждую лунку добавляли 50 мкл диметилсульфоксида и инкубировали в течение 10 мин для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли при 620 нм в мультилуночном планшете ELISA (Thermo Multiskan EX, США). Величину оптической плотности (OD) использовали для расчета процента жизнеспособности по следующей формуле:

$$\begin{aligned} \% \text{ жизнеспособности} &= \\ &= (OD \text{ экспериментального образца} / \\ &/ OD \text{ экспериментального контроля}) \times 100. \end{aligned}$$

Флуоресцентный микроскопический анализ апоптотической гибели клеток. Приблизительно

1 мкл смеси красителей (100 мг/мл акридинового оранжевого (АО) и 100 мг / мл этидия бромид (EtBr) в дистиллированной воде) смешивали с 90 мкл клеточной суспензии ($1 \cdot 10^5$ кл./мл) на чистом покровном стекле. Обработанные раковые клетки собирали, промывали натрий-фосфатным буфером (PBS) (pH 7,2) и окрашивали 10 мкл АО/EtBr. После инкубации в течение 2 мин клетки дважды по 5 мин промывали PBS и визуализировали под флуоресцентным микроскопом (Nikon Eclipse Inc, Япония) при увеличении 400 \times с фильтром возбуждения при 480 нм.

Аналогично клетки высевали на стеклянное покровное стекло в 24-хлуночном планшете и обрабатывали комплексом в течение 24 ч. Фиксированные клетки пермеабилizировали с помощью 0,2%-го раствора тритона X-100 (50 мкл) в течение 10 мин при комнатной температуре и инкубировали 3 мин с 10 мкл флуоресцентного красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), поместив покровное стекло поверх клеток, чтобы обеспечить равномерное распределение пятна. Наблюдения осуществляли в люминесцентном микроскопе (Nikon Eclipse Inc, Япония).

Окрашивание родамином 123. Родамин123 представляет собой флуоресцентный краситель, который связывается с метаболически активными митохондриями. Клетки MCF-7 обрабатывали соединением P-AgNP в течение 24 ч. Клетки промывали PBS (pH 7,4), фиксировали ледяным 70%-м этанолом и инкубировали с 5 мкг/мл родамина 123 при 37 $^{\circ}$ C в течение 30 мин. Затем клетки промывали PBS и исследовали под флуоресцентным микроскопом Nikon Eclipse (Nikon Instruments Inc., США).

Анализ клеточного цикла. Клетки MCF-7 ($1 \cdot 10^5$ кл./мл) высевали в шестилуночный планшет. После 24-часовой инкубации при 37 $^{\circ}$ C (в атмосфере с 5% CO₂) среду заменяли свежей, содержащей (опыт) или не содержащей (контроль) P-AgNP (1, 2 и 4 мкМ). После 24-часовой инкубации клетки собирали трипсином, промывали PBS, фиксировали в 70%-м этаноле и выдерживали при -20 $^{\circ}$ C в течение 1 ч. Клеточную ядерную ДНК окрашивали иодидом пропидия согласно прописи: клетки после удаления этанола промывали PBS, суспендировали в 0,5 мл PBS, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия и 100 мкг/мл РНКазы, и инкубировали при 37 $^{\circ}$ C в течение 30 мин. Поточковую цитометрию проводили в двух образцах с помощью проточного цитометра BD FACS (BD Biosciences, США). Для каждого образца было собрано 10000 отсчетов, интенсивность флуорес-

центного сигнала была записана и проанализирована с помощью программного обеспечения BD CellQuest Pro.

Распределение по фазам с помощью флуоцитометрии. Выбранные клеточные линии (в количестве 2 $\cdot 10^5$ клеток на 10-сантиметровую чашку Петри) обрабатывали различными концентрациями соединений P-AgNP в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием, промывали ледяным PBS и затем ресуспендировали с ледяным 70%-м этанолом в течение ночи. Далее клетки обрабатывали РНКазой (10 мкг/мл) при 37 $^{\circ}$ C, затем центрифугировали и окрашивали раствором иодида пропидия (40 мкг/мл) в течение 30 мин. Содержание ДНК измеряли с помощью проточной цитометрии (BD FACS, BD Biosciences, США).

Статистика. Все эксперименты *in vitro* проводили в трех параллелях, сами эксперименты повторяли по крайней мере трижды. Для анализа использовали статистическое программное обеспечение SPSS, версия 17.0. Значение $P < 0,01$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация грибов. Выделенный эндофитный гриб характеризовали ПЦР-амплификацией гена рНК 18S с использованием праймеров ITS. Амплифицированный продукт ПЦР имел размер около 600 bps. BLAST-анализ, парное и множественное выравнивание последовательностей выявляли идентичность 94–100% с последовательностями штамма ATLOY-4, обозначенного как *Fusarium solani* и депонированного в NCBI GenBank (код доступа KX957966). Множественное выравнивание последовательности выполняли с использованием ClustalW2 с параметрами по умолчанию. Филогенетическое дерево (рис. 1) было построено методом «присоединения соседей» с нуклеотидными попарно генетическими корреляциями расстояния. Для проверки надежности топологии дерева в процентах от 1000 повторений проводили бутстрап-тест филогении (тестирование методом размножения выборок). Изоляты эндофитного гриба *F. solani* были дополнительно идентифицированы с помощью молекулярного филогенетического анализа последовательностей ITS-1 и ITS-4. Как правило, выявлялось хорошее согласие между морфологическими и основанными на ITS подходами. Филогенетический анализ, основанный на секвенировании рДНК, позволил нам показать наличие генетической изменчивости среди изолятов рода *Fusarium*.

Визуальный анализ наночастиц серебра с плюмбагином. Синтезируемые P-AgNP в основном имели окраску от бледно-белой до красновато-коричневой. Изменение цвета происходило из-за возбуждения поверхностного плазмонного резонанса в наночастицах металлического серебра. Изменение цвета указывает на превращение ионов серебра (Ag^+) в нейтральные атомы (Ag^0) в наночастицах. Хорошо известно, что наночастицы серебра имеют темно-коричневый цвет в водном растворе из-за поверхностного плазмонного резонанса. Завораживающие яркие цвета металлических наночастиц связаны с локализованным поверхностным плазмонным резонансом. Применение металлических наночастиц расширилось из-за поверхностного слияния с молекулярными биомаркерами с сильным оптическим поглощением, связанным с поверхностным плазмонным резонансом.

УФ-видимый спектральный анализ наночастиц серебра с плюмбагином. УФ-видимые спектры синтезированных P-AgNP *Fusarium solani* показали характерный пик при 450 нм (рис. 2), который подтвердил синтез P-AgNP. Различные метаболиты и белки, присутствующие во внеклеточном грибном фильтрате, могут быть ответственны за синтез и стабилизацию P-AgNP, что дополнительно подтверждается анализом с применением инфракрасной Фурье-спектроскопии. P-AgNP, синтезированные из эндофитного гриба ATLOY-4, показали после 24-часовой инкубации пик, обусловленный биоредукцией нитрата серебра в наночастицы серебра. Поверхностные пики плазмонного резонанса в наночастицах серебра также были расположены на 450 нм. Известно, что сферические серебряные наночастицы могут проявлять максимальный пик в районе 420–450 нм [24].

Результаты исследования наночастиц серебра с плюмбагином с применением инфракрасной Фурье-спектроскопии. Анализ проводили для определения биоактивных молекул, специфически связанных с частицами серебра, которые участвуют в восстановлении, кепировании и стабилизации. Приведенные результаты (рис. 3) показали резкий пик поглощения широкополосного спектра на 3432 см^{-1} из-за валентных колебаний групп $-N-H$ и $-O-H$, а полоса поглощения при 2925 см^{-1} возникла благодаря $-C-H$ -группе. Полоса поглощения на 1633 см^{-1} появлялась из-за валентных колебаний $C=C$, тогда как полоса поглощения при 1380 см^{-1} обусловлена присутствием $C-N$ -подобных аминных или $C-O$ -подобных фенольных групп. Два пика, зарегистрированные при 1252 и 1040 см^{-1} , обусловлены наличием валентных ко-

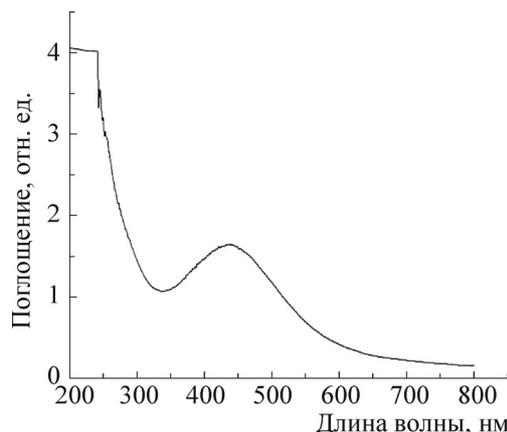


Рис. 2. УФ-спектральный анализ P-AgNP, демонстрирующий пик на 450 нм.

лебаний $C-N$ (алифатического амина). Одна слабая полоса при 647 см^{-1} обусловлена внеплоскостными деформационными колебаниями групп $C-H$. Результаты инфракрасной Фурье-спектроскопии подтверждают наличие групп $-NH$, $-OH$, $C=C$ и $-CH$, что свидетельствует о наличии гидроксильных и аминогрупп в водном экстракте из микробов. Пики, зарегистрированные при 1380 см^{-1} в водном экстракте эндофитного гриба *Fusarium sp.*, экспрессированного в P-AgNP, показали, что аминогруппы частично используются для инкапсуляции и стабилизации P-AgNP. На основе наших наблюдений была выдвинута гипотеза о том, что микосинтез наночастиц происходит в два этапа: сжатие и кепирование. Анализ методом инфракрасной Фурье-спектроскопии проводили для определения возможного взаимодействия между серебром и биоактивными молекулами, которые отвечают за синтез и стабилизацию P-AgNP.

Анализ наночастиц серебра с плюмбагином методом сканирующей электронной микроскопии. Исследование методом СЭМ проводили для определения морфологии и размеров деталей синтезированных наночастиц серебра (рис. 4). Показано, что размеры P-AgNP составляли в среднем $23,2 \times 33,2 \times 33,7$ нм. Микрофотографии СЭМ показали относительно сферические наночастицы с равномерным распределением по размерам. Средний размер частиц лежал в диапазоне от 20,0 до 40,0 нм. СЭМ является наиболее широко используемым методом для характеристики наночастиц с точки зрения их физической морфологии. Кеппинг P-AgNP предотвращал агрегацию частиц и стабилизировал среду.

Рентгеноструктурный анализ наночастиц серебра с плюмбагином. Рентгенодифракционный профиль гибридных серебряных наночастиц

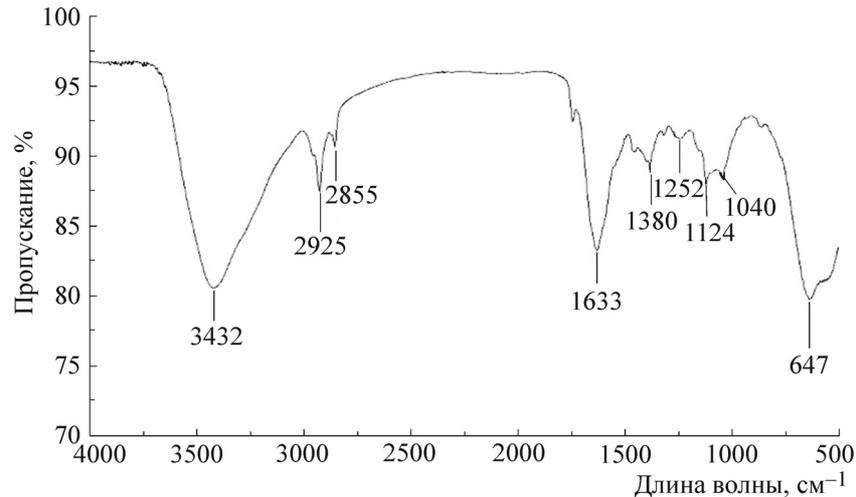


Рис. 3. ИК-Фурье-спектральный анализ P-AgNP.

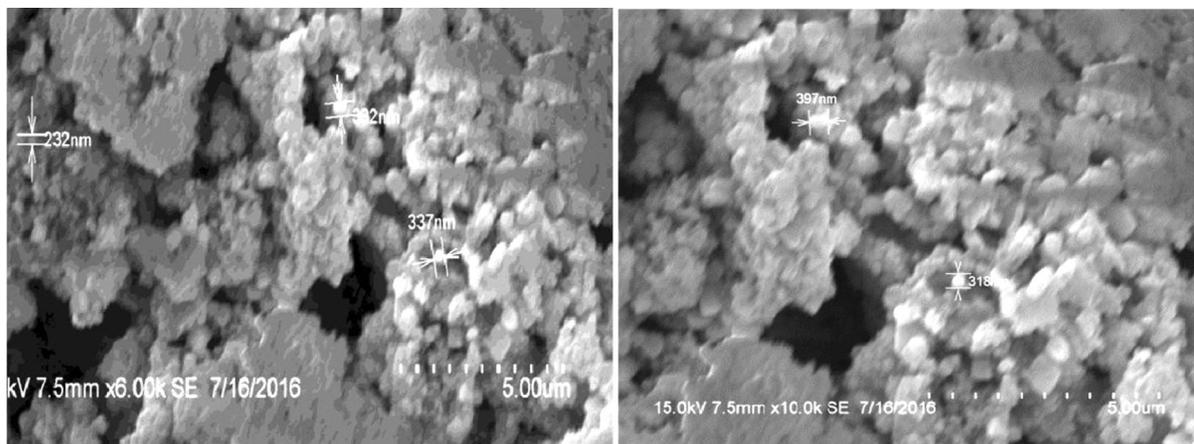


Рис. 4. Изображения P-AgNP, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии.

(рис. 5) показал пять основных характеристических линий около 27,51, 31,94, 45,90, 55,74 и 57,33°, соответственно соответствующих ориентационным плоскостям (111), (200), (220), (111) и (222). Рентгенограммы показали, что гибридные P-AgNP имеют поликристаллическую структуру. Наблюдаемая дифракционная картина гибридных P-AgNP соответствовала ожиданиям. Неассоциированные пики могли быть вызваны кристаллизацией биоорганической фазы, которая возникает на поверхности наночастицы. На рентгенодифракционных картинах P-AgNP наблюдались видимые широкие пики. По рентгенограммам согласно уравнению Шеррера был рассчитан средний диаметр частиц P-AgNP. Использовали значения полной ширины пиков при половинном максимуме для плоскостей отражения (111), (200), (220), (111) и

(222). Было обнаружено, что средний размер кристалла составляет около 14,2 нм.

Антибактериальная активность наночастиц серебра с плюмбагином. Микосинтезированные P-AgNP имели самую низкую эффективность ингибирования против бактериального возбудителя. Значения зон ингибирования представлены в таблице. AgNP демонстрировали хорошую антибактериальную активность с зонами ингибирования против человеческих патогенов. Разная концентрация (0,5 и 1 мг/мл) этилацетатного экстракта *P. fulgens* показала довольно низкую степень антибактериальной активности против десяти патогенов человека. Зоны ингибирования были зарегистрированы для *S. epidermids* (10 мм, 12 мм), *E. coli* (14 мм, 16 мм), *V. parahaemolyticus* (14 мм, 18 мм), *P. vulgaris* (11 мм, 13 мм), *K. pneumoniae* (13 мм, 16 мм), *Y. enterocolitica* (11 мм, 14 мм), *S. typhimurium*

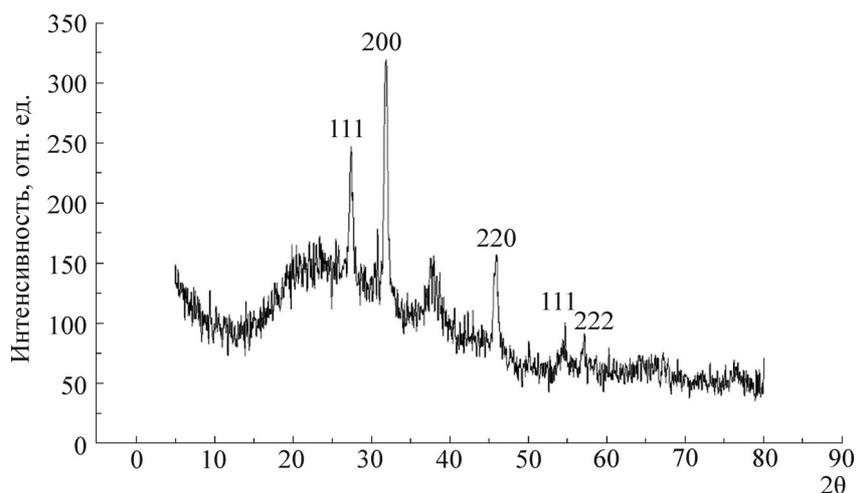


Рис. 5. Рентгенодифракционный профиль гибридных P-AgNP.

(13 мм, 16 мм), *S. aureus* (10 мм, 14 мм) и *M. luteus* (10 мм, 14 мм) соответственно. Их сравнивали со стандартным антибиотиком стрептомицином (10 мкг/мл) и дистиллированной водой, используемой в качестве отрицательного контроля. Синтезированные P-AgNP показали низкую ингибирующую эффективность против грамотрицательных и грамположительных бактериальных патогенов. Точный механизм тормозного действия наночастиц серебра до сих пор не ясен. Результаты показывают, что ингибирование может быть вызвано либо плазмоллизом, либо ионами серебра, которые могут проникать в стенку бактериальных клеток и вызывать повреждение ДНК.

Анализ цитотоксичности наночастиц серебра с плюмбагином. Мы исследовали влияние синтезированных P-AgNP на клеточный ответ линий клеток MCF-7 и НЕК человека с использованием МТТ-теста. На рис. 6 показана цитотоксическая активность *in vitro* P-AgNP (в концентрации 5–25 мкг/мл) против клеток MCF-7. Экспериментальные результаты показывают, что P-AgNP обладают способностью ингибировать клеточную пролиферацию дозозависимым образом, в качестве контроля (без обработки) рассчитали значения IC_{50} P-AgNP против клеток MCF-7 и НЕК, которые составляли $14,5 \pm 0,5$ мкг/мл и $21,5 \pm 0,5$ мкг/мл соответственно. Из результатов видно, что по

Антибактериальная активность P-AgNP

Код и название микроорганизма	Зона ингибирования, мм			
	Концентрация образца, мг/мл			
	H ₂ O	S	0,5	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> (111)	–	19	–	–
<i>Staphylococcus epidermids</i> (3615)	–	15	10	12
<i>Escherichia coli</i> (25922)	–	17	14	16
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (451)	–	19	14	18
<i>Proteus vulgaris</i> (1771)	–	18	11	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC1706)	–	23	13	15
<i>Yersinia enterocolitica</i> (840)	–	17	13	16
<i>Salmonella typhimurium</i> (1251)	–	18	11	14
<i>Staphylococcus aureus</i> (96)	–	18	13	16
<i>Micrococcus luteus</i> (106)	–	18	10	14

Примечание. S – Стрептомицин (контроль).

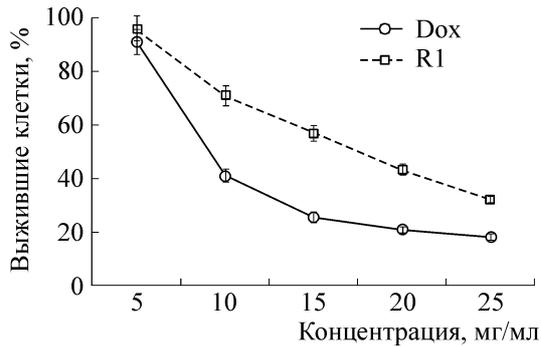


Рис. 6. Анализ цитотоксичности методом МТТ.

наблюдаемым значениям IC_{50} P-AgNP значительно ингибировали пролиферацию клеток рака молочной железы в условиях *in vitro*.

Морфологическое исследование клеток MCF-7, обработанных наночастицами серебра с плюмбагином. Морфологию клеток MCF-7 и НЕК в присутствии и отсутствии P-AgNP также изучали с использованием инвертированной фазовой контрастной микроскопии. Клетки различных концентрационных групп показаны на рис. 7. Клетки, предварительно обработанные

P-AgNP, были разнородны по своей природе с контролем. В контроле клетки были плотно упакованы и имели форму веретена. Клетки, обработанные P-AgNP, останавливали клеточный рост, хотя многие из клеток все еще были прикреплены к их культуральным планшетам. Многие из клеток имели неправильные клеточные мембраны и пузыри, была очевидна их апоптотическая активация.

Метод окрашивания акридиновым оранжевым/этидием бромидом. Для выяснения апоптотической активности синтезированных клеток, обработанных P-AgNP, флуоресцентный микроскопический анализ проводили с использованием флуоресцентных пятен АО/EtBr. Полученные методом флуоресцентной микроскопии изображения клеток MCF-7 в отсутствие P-AgNP (контроль) и в присутствии AgNP в различных концентрациях показаны на рис. 8; видно, что необработанные раковые клетки MCF-7 (рис. 8а) не показали какого-либо значительного отрицательного действия по сравнению с раковыми клетками, обработанными P-AgNP в различных концентрациях (рис. 8б–г). Можно заметить, что с добавлением P-AgNP клетки приобретали оранжево-красный цвет вследствие

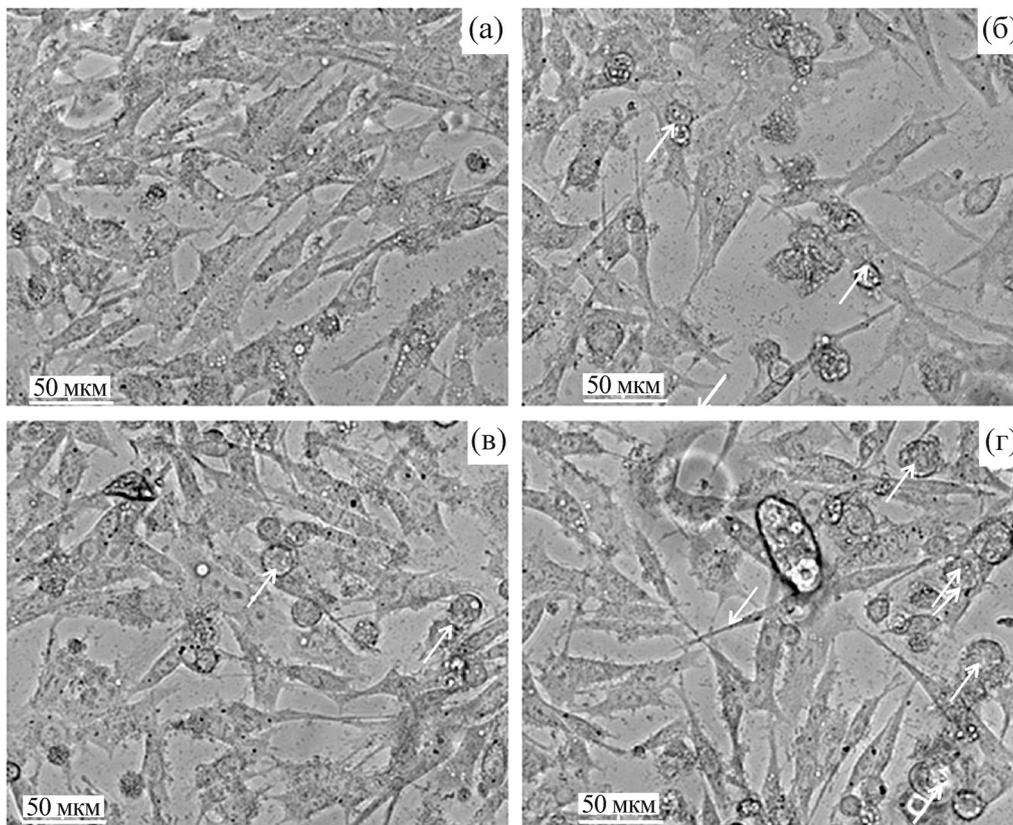


Рис. 7. Морфологическое исследование клеток MCF-7, обработанных P-AgNP в различных (б–г) концентрациях (20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 60 мкг/мл соответственно); (а) – контроль. Стрелки обозначают клетки, покрытые оболочкой.

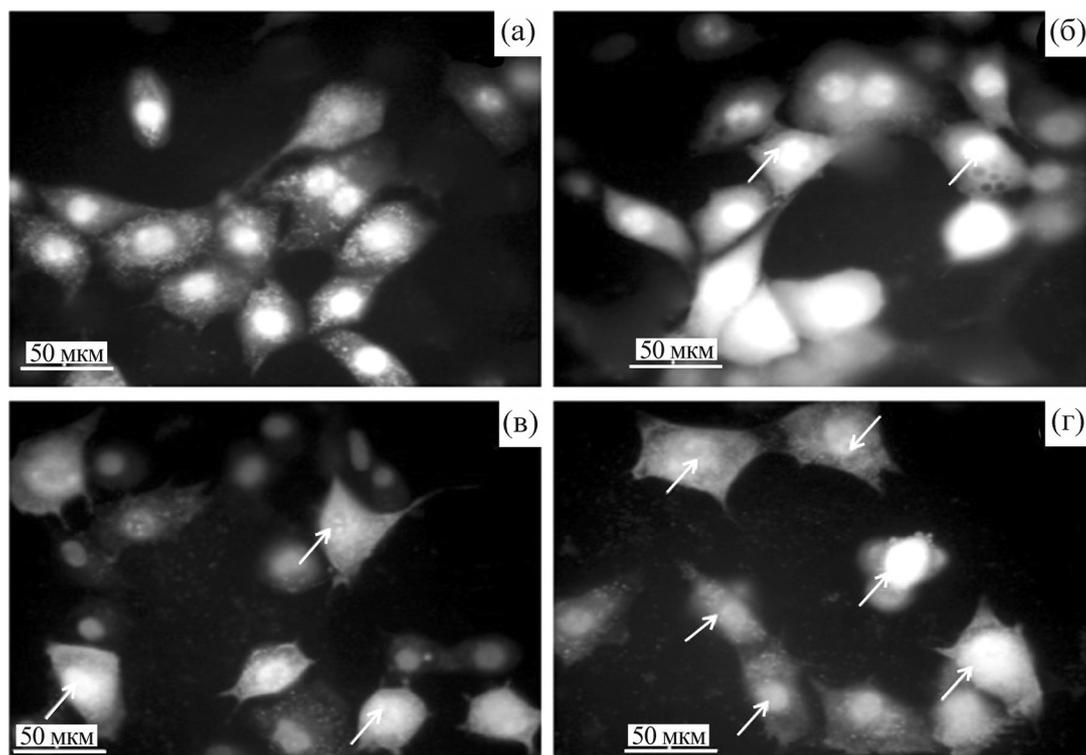


Рис. 8. Апоптотический анализ клеток MCF-7, окрашенных АО/EtBr после обработки P-AgNP в различных (б–г) концентрациях (20 мкг/мл, 40 мкг/мл и 60 мкг/мл соответственно) по сравнению с необработанными клетками (а). Стрелки указывают на апоптотические клетки.

индуцированного апоптоза и конденсации ядра в остатках клеток. P-AgNP вызывал меньшую интенсивность флуоресценции вследствие уменьшенного уровня индукции апоптоза в клетках MCF-7. Таким образом, жизнеспособные клетки и клетки в раннем и позднем апоптозе можно дифференцировать, используя окрашивание АО/EtBr.

Акридиновый оранжевый – это краситель для прижизненной окраски клеток, который окрашивает как живые, так и мертвые клетки, этидиум бромид только окрашивает клетки, которые утратили целостность мембраны, а живые и здоровые клетки кажутся равномерно окрашенными. Жизнеспособные клетки имеют однородные ярко-зеленые ядра. Ранние апоптотические клетки имеют зеленые ядра, но конденсация с чередованием хроматина видна как яркие зеленые пятна или фрагменты. Поздние апоптотические клетки имеют оранжево-красные ядра с конденсированной структурой. Некротические клетки окрашиваются в оранжевый цвет, но имеют ядерную морфологию, напоминающую ядра живых клеток, без конденсированного хроматина.

Окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом. Чтобы дополнительно подтвердить ядерную конденсацию и фрагментацию P-AgNP на

отдельных раковых клетках, мы использовали метод окрашивания DAPI. Полученные методом флуоресцентной микроскопии изображения клеток рака молочной железы через 24 ч, окрашенные DAPI в присутствии и отсутствии P-AgNP, показаны на рис. 9. Было установлено, что P-AgNP демонстрируют более высокий уровень ядерной фрагментации, а также что необработанные клетки не показали значительных изменений в явном виде, тогда как обработанные P-AgNP раковые клетки MCF-7 демонстрируют яркие снимки, которые указывают на конденсированный хроматин и ядерные фрагментации в раковых клетках (рис. 9б–г).

Апоптотические клетки были обнаружены с помощью метода ядерного окрашивания DAPI. Известно, что они образуют флуоресцентные комплексы с двухцепочечной ДНК. Морфологическое изменение, такое как усадка клеток, округление и отслоение клеток из колбы, было типично для апоптоза, что наблюдалось методом флуоресцентной микроскопии. DAPI-окрашивание использовали для визуализации повреждения нуклеосомной ДНК. Клеточная гибель клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека Нер 3В, обработанных этанольными экстрактами *Euchrestaformosana*

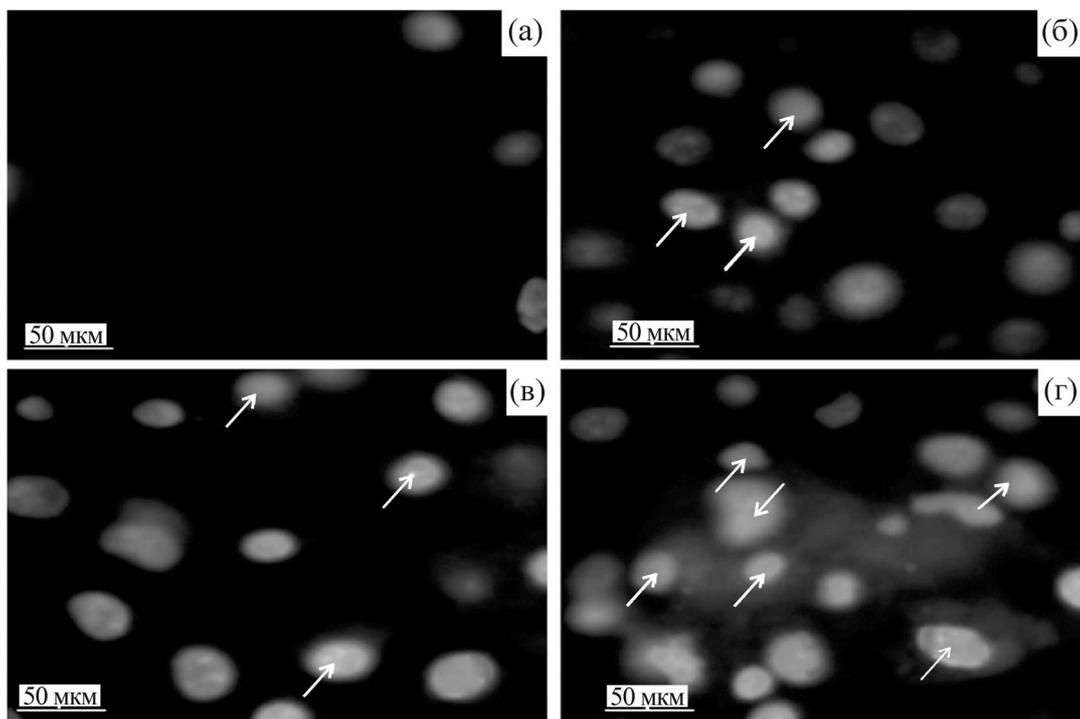


Рис. 9. Окрашивание DAPI контрольных (а) и обработанных P-AgNP в различных (б–г) концентрациях (5, 10 и 20 мкг/мл соответственно) клеток MCF-7 показало конденсированную форму ядерного содержимого в апоптотических клетках. Стрелки указывают на апоптотические клетки.

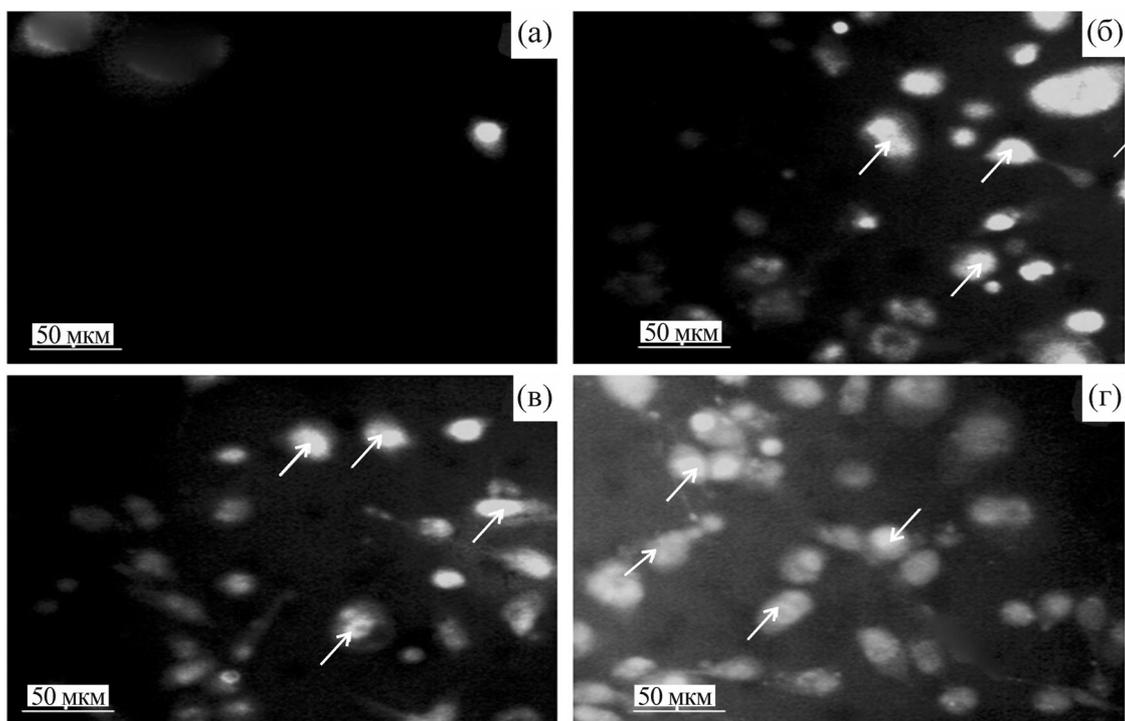


Рис. 10. Флуоресцентный анализ с помощью Родамина-123. Окрашенные родамином 123 контрольные клетки MCF-7 (а) и клетки, обработанные P-AgNP в различных (б–г) концентрациях (5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл соответственно), показали конденсированную форму ядерного содержимого в апоптотических клетках. Стрелки указывают на апоптотические клетки.

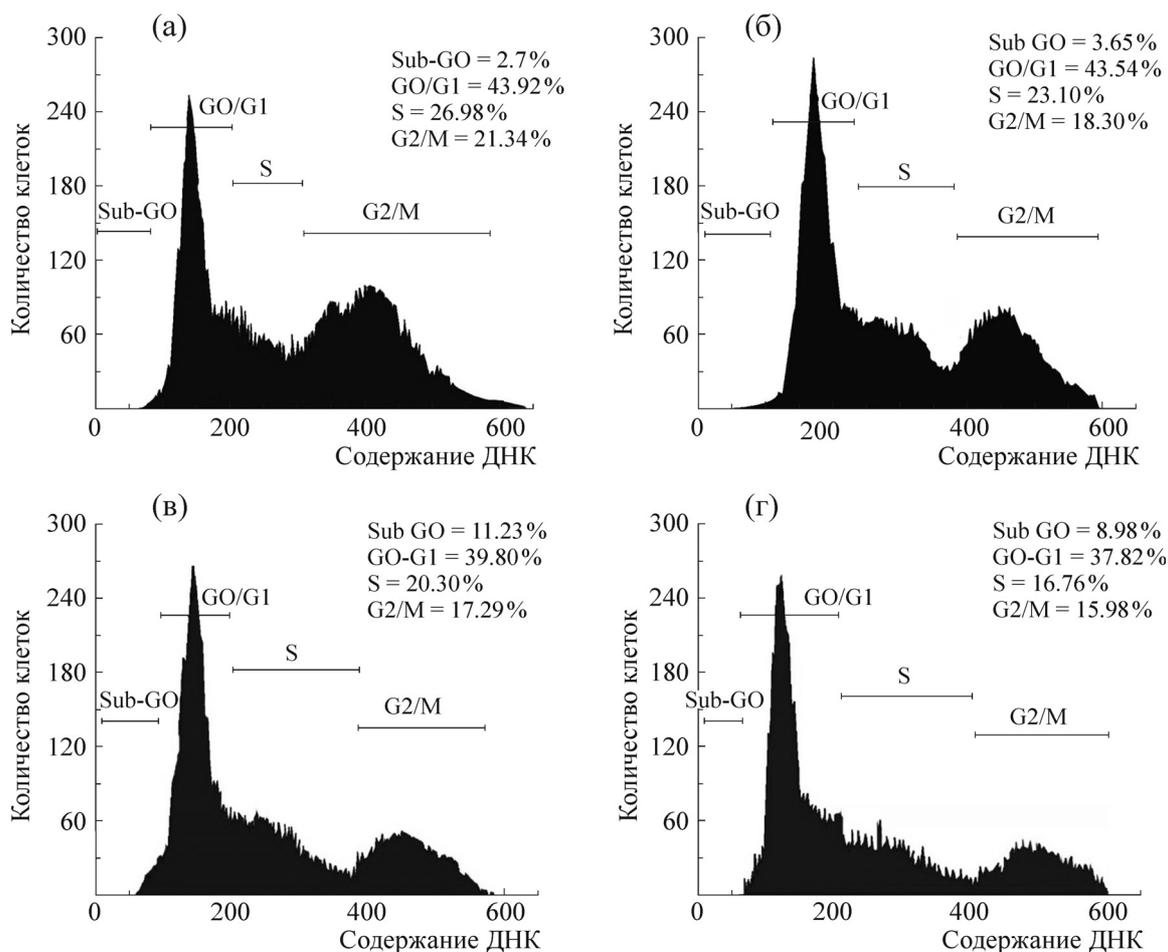


Рис. 11. Анализ остановки клеточного цикла методом проточной цитометрии. Представлен арест клеточного цикла контрольных клеток (а) и клеток, обработанных Р-AgNP в различных (б–г) концентрациях (5, 10 и 20 мкг/мл соответственно).

radix, была идентифицирована как апоптоз с использованием окрашивания DAPI [25]. Раковые клетки молочной железы человека, обработанные экстрактами *Astrodaucus persicus*, показали потенциальное снижение пролиферации клеток путем окрашивания DAPI [26]. Таким образом, по результатам анализа МТТ и анализа с помощью флуоресцентной микроскопии (АО/EtBr и DAPI) мы с уверенностью говорим, что Р-AgNP могут использоваться в качестве мощных терапевтических агентов против различных видов рака.

Окрашивание родамином 123. Митохондриальный мембранный потенциал, $\Delta\psi_m$, является важным параметром митохондриальной функции, используемой в качестве индикатора здоровья клеток. Его можно оценить при окрашивании родамином 123. Красная флуоресценция наблюдается в клетках с высоким мембранным потенциалом. Мы обнаружили, что после лечения Р-AgNP потенциал митохондриальной

мембраны уменьшался в клетках MCF-7, о чем свидетельствует уменьшение флуоресценции по сравнению с необработанными клетками.

Среди этих красителей родамин 123 впервые был использован для измерения $\Delta\psi_m$ в интактных клетках с использованием микроскопического пятна, а также цитофлуорометрией путем мониторинга увеличения флуоресценции из-за его электрофоретического накопления в митохондриях. В изолированных митохондриях впервые было показано, что возбуждение индуцирует красное смещение и обширное гашение флуоресценции родамин 123, поэтому накопление красителя может быть предложено как чувствительный и специфический зонд для $\Delta\psi_m$ [27].

Арест клеточного цикла. Пролиферация может отслеживаться по нарушению клеточного цикла, для проверки гипотезы анализ клеточного цикла проводился после 12-часового воздействия на клетки Р-AgNP в различной концентрации. Как показано на рис. 11, мы обна-

ружили, что изначально все красители были способны стимулировать клеточный цикл на разных фазах. Для необработанных клеток или контроля было зарегистрировано накопление клеток в фазах G0/G1, S и G2/M. Процент клеток в фазе G0/G1 после воздействия оставался постоянным. Более того, дублирование ДНК было повышенным по сравнению с контролем в случае воздействия P-AgNP. Результат показал, что пролиферативный эффект P-AgNPs может преимущественно проистекать из индукции активации фазы клеточного цикла после остановки, в основном в фазе дублирования ДНК.

Арест клеточного цикла может также включать апоптоз. Циклины – это белки, регулирующие циклинзависимые киназы, активность которых, в свою очередь, регулирует переходы контрольных точек клеточного цикла. Один из таких циклин участвует в переходе клеток из G1 в S-фазу клеточного цикла. Было показано, что чрезмерная экспрессия циклина имеет место во многих случаях рака, также было показано, что ингибирование экспрессии циклина может помочь в лечении рака. В нескольких исследованиях было отмечено, что снижение уровня циклина связано с апоптозом [28]. В настоящем исследовании мы наблюдали снижение уровня экспрессии циклина, которое могло бы, вероятно, опосредовать антипролиферативное и апоптотическое действие P-AgNP.

ВЫВОДЫ

В настоящем исследовании сообщается о простом и экологически безопасном подходе к биосинтезу P-AgNP с использованием водного культурального фильтрата *Fusarium solani*, эндофитного гриба, выделенного из переходной зоны *plumbago rosea*. Гриб был изолирован и идентифицирован морфологически как *Fusarium solani* на основе молекулярной характеристики гена rsNA 18s. Синтезированные наночастицы серебра характеризовались с использованием УФ-спектроскопии, ИК-Фурье-спектроскопии, рентгенодифракционного анализа и сканирующей электронной микроскопии. Синтезированные P-AgNP были очень стабильными и биосовместимыми. Биосинтезированные P-AgNP демонстрировали эффективную противоопухолевую активность. Результаты цитотоксических исследований показали, что биосинтезированные P-AgNP могут быть использованы в качестве противораковых агентов в ближайшем будущем. Следовательно, этот метод может использоваться во многих медицинских приложениях.

Авторы выражают благодарность Агентству «Таймс оф Индия» и Колледжу Лойола, Ченнай за предоставление финансовой помощи (4LCTOI114PBV002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. U. Kreibitz and M. Vollmer, in *Optical Properties of Metal Clusters* (Springer, Berlin, New York, 1995), pp. 483–525.
2. V. R. Netala, M. S. Bethu, B. Pushpalatha, et al., *Int. J. Nanomedicine* **11**, 5683 (2016).
3. M. Gratzel, *Nature* **414**, 338 (2001).
4. Y. Shiraishi and N. Toshima, *J. Mol. Catal. A* **141**, 187 (1999).
5. D. A. Groneberg, M. Giersig, T. Welte, and U. Pison, *Curr. Drug Targets* **7**, 643 (2006).
6. G. S. Rathna, A. Elavarasi, S. Peninal, et al., *Int. J. Pharm. Biol. Archives* **4**, 481 (2013).
7. A. Ingle, A. Gade, S. Pierrat, et al., *Curr. Nano* **4**, 141 (2008). <http://dx.doi.org/10.2174/157341308784340804>.
8. I. Ingle, A. Gade, M. Bawaskar, and M. Rai, *J. Nanopart. Res.* **11**, 2079 (2011). <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-008-9573-y>.
9. A. K. Gade, P. Bonde, A. P. Ingle, et al., *J. Biobased. Mater. Bioener.* **2**, 243 (2008). <http://dx.doi.org/10.1166/JPMB.2008.401>.
10. M. Gajbhiye, J. Kesharwani, A. Ingle, et al., *Nanomedicine: Nanotech. Biol. Med.* **5**, 382 (2009). <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.06.005>.
11. M. Bawaskar, S. Gaikwad, A. Ingle, et al., *Curr. Nanosci.* **6**, 376 (2010).
12. A. Ashkenazi and V. M. Dixit, *Science* **281**, 1305 (1998).
13. A. Ashkenazi, *Nat. Rev. Cancer* **2**, 420 (2002).
14. S. A. Susin, H. K. Lorenzo, N. Zamzami, et al., *Nature* **397**, 441 (1999).
15. J. C. Lee, E. Lobkovsky, N. B. Pliam, et al., *J. Org. Chem.* **60**, 7076 (1995).
16. J. Y. Li and G. A. Phytochemistry **57**, 261 (2001).
17. S. S. Sardul, K. Suneel, and P. A. Ravindra, *Inter. J. Res. Pharm. Chem.* **4**, 611 (2014).
18. S. Dattu, R. Vandana, N. Shivaraj, et al., *Bioinorg. Chem. and Applications* **7**, 1 (2013).
19. C. H. Ramamurthy, M. Padma, I. D. Samadanam, et al., *Colloids Surf. B Biointerfaces* **102**, 808 (2013).
20. V. R. Netala, M. S. Bethu, B. Pushpalatha, et al., *Int. J. Nanomedicine* **11**, 5683 (2016).
21. A. R. Bindu, J. Rosemary, and S. Akhila, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**, 581 (2014).
22. C. Sunil, S. Ignacimuthu, and P. Agastian, *J. Ethnopharmacol.* **134**, 298 (2011).
23. L. Glorybal, K. B. Kannana, M. V. Arasu, et al., *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **14**, 1 (2015).
24. K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **107**, 668 (2003).

25. H. F. Hsu, K. H. Huang, K. J. Lu, et al., *J. Ethnopharmacol.* **135**, 492 (2011).
26. M. H. Abdolmohammadi, S. H. Fouladdel, A. Shafiee, et al., *DARU J. Pharm. Sci.* **16**, 112 (2008).
27. H. F. Liao, Y. J. Chen, C. H. Chou, et al., *Toxicol. in Vitro*, **25**, 206 (2011).
28. M. Lanzino, D. Sisci, C. Morelli, et al., *Nucl. Acids Res.* **38** (16), 5351 (2010).

Biosynthesis of Ag Nanoparticles in Plumbagin Using the Endophytic Fungus *Fusarium solani* Isolated from an Endangered Medicinal Plant *Plumbago rosea* and Their Antibacterial and Anticancer Activity against Human Breast Cancer Cells

T.J. Sales, P.P. Clarence, L.J. Lalitha, and P. Agastian

*Ethnopharmacology and Microbial Biotechnology Research Unit, Department of Plant Biology and Biotechnology
Loyola College, Chennai 600034, Tamil Nadu, India*

Among the most hopeful biomaterials, metallic nanoparticles with antibacterial and anticancer properties are expected to open new avenues to fight and prevent various cancer and infectious diseases. The current study describes biosynthesis of plumbagin-caged silver nanoparticles (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone–AgNPs or PCSNs) using the endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from an endangered medicinal plant *Plumbago rosea*. The fungus was identified according to its morphological characteristics based on the analysis of the sequence of the ITS region of nuclear ribosomal DNA. The synthesized PCSNs were initially noticed through visual color change from yellow to reddish brown and further confirmed by the surface plasmon resonance band at 450 nm using UV-visible spectroscopy. Fourier transform infrared spectroscopy showed amines and amides that are responsible for PCSNP stability. High-resolution scanning electron microscopy showed that PCSNs were well dispersed, spherical, and were in the size range of 23.2, 33.2 and 33.7 nm. X-ray diffraction study revealed a crystalline nature of PCSNs. These PCSNPs showed good antibacterial activity in a dose dependant manner. The synthesized PCSNs exhibited dose-dependent cytotoxicity against MCF-7 human breast cancer cells, the inhibitory IC_{50} were found to be 14.5 $\mu\text{g/ml}$. These nanoparticles were further studied for their anticancer activity and showed high selective toxicity against the MCF-7 breast cancer cell line. The anticancer activity also executed through inhibiting the cells during the phase of DNA synthesis.

Keywords; Plumbago rosea, Fusarium solani, PCSN, antibacterial activity, cytotoxicity assay