

УДК 579:582.26

ПРОДУКЦИЯ ДИАДИНОКСАНТИНА В ИНТЕНСИВНОЙ КУЛЬТУРЕ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Cylindrotheca closterium* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN. И ЕГО ПРОАПОПТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2022 г. Р. Г. Геворгиз¹, *, М. А. Гуреев², **, С. Н. Железнова¹,
Е. В. Гуреева¹, М. В. Нехорошев¹

¹Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского” РАН, Севастополь, 299011 Россия

²Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова,
Центр цифрового биодизайна и персонализированной медицины, Москва, 119991 Россия

*e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru

**e-mail: max_technik@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2021 г.

После доработки 29.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Изучена продукция диадинаксантина в интенсивной культуре *Cylindrotheca closterium*, а также его цитостатическая активность методами молекулярного моделирования и исследованиями на культурах опухолевых клеток человека: OVCAR5, OVCAR8, KURAMOCHI и OVSAHO. По результатам как вычислительного эксперимента, так и эксперимента с культурами клеток диадинаксантин демонстрирует более низкую активность по сравнению с фукоксантином (более чем в 4 раза). Величина IC₅₀ диадинаксантина достигалась при >100 мкМ, в то время как фукоксантин проявлял цитостатическое действие в пределах 18.75 мкМ. В проточной культуре *Cylindrotheca closterium* продукция диадинаксантина может превышать продукцию фукоксантина в 14 раз, что может сделать технологию его получения менее затратной и существенно снизить себестоимость лечебно-профилактических препаратов на основе микроводорослей.

Ключевые слова: морские микроводоросли, каротиноиды, *Cylindrotheca closterium*, молекулярный докинг, рак яичников, противоопухолевая активность

DOI: 10.31857/S0555109922010032

Морская диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* является источником целого ряда биологически активных веществ, которые представляют большой интерес для современной медицины и биотехнологии [1–3]. Особый интерес представляют каротиноиды морского генезиса, поскольку их биологическая активность позволяет создавать высокоэффективные препараты для профилактики и лечения тяжелых заболеваний. Например, фукоксантин (Fх), доля которого в биомассе *C. closterium* достигает 2% от сухой массы, являясь уникальным каротиноидом с алленовой связью проявляет высокую противоопухолевую активность [3, 4], а также цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака простаты PC-3, DU145 и LNCaP [5, 6], индуцирует апоптоз лейкозных клеток HL-60 и клеток рака толстой кишки Saco-2, HT-29 и DLD-1 [5–7], останавливая клеточный цикл в клетках GOTO нейробластомы и др.

Технология получения Fх в интенсивной культуре микроводорослей, как правило, основана на

двухстадийном накопительном культивировании [8, 9]: на первом этапе культивирования (экспоненциальная фаза роста) происходит накопление биомассы, а на втором (стационарная фаза роста) — биосинтез Fх. Накопление Fх наблюдается в условиях стресса, например при лимитировании роста биогенными элементами, поэтому именно условия второго этапа культивирования определяют количество синтезируемого Fх в клетках. Однако существенным недостатком двухстадийного накопительного культивирования является гибель небольшой части клеток микроводорослей в условиях стресса, поскольку в клетках микроводорослей происходит множество неустойчивых и неуправляемых деструктивных процессов, что в значительной мере снижает предсказуемость накопления Fх в технологическом процессе и эффективность технологии получения целевого продукта в целом.

Известно, что Fх является побочным продуктом диадинаксантинового цикла у диатомовых

водорослей [10, 11]. Именно при неблагоприятных условиях окружающей среды из диатиноксантина (Ddx) синтезируется Fx, что обуславливает накопление Ddx в экспоненциальной фазе, а Fx в стационарной фазе роста. Такая физиологическая особенность диатомовых водорослей дает возможность при разработке промышленной технологии получения Ddx этап создания стрессовых условий исключить, что в значительной мере ее упрощает и удешевляет, а также повышает эффективность процесса.

Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных исследованию проаптоптической активности каротиноидов морских организмов [12–16], данные об активности Ddx в литературе до сих пор отсутствуют.

Цель работы – изучение продукции Ddx в интенсивной культуре диатомовой водоросли *C. closterium* и оценка цитостатического эффекта Ddx методами молекулярного моделирования, а также на культурах опухолевых клеток человека.

МЕТОДИКА

Условия культивирования. *C. closterium*, полученную из коллекции культур ФИЦ Институт биологии южных морей РАН выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объемом 3 л и толщиной рабочего слоя 5 см, при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$, при круглосуточном освещении белыми люминесцентными лампами СЕРИЛ1LF36W/54-765-2450 lm, которые на рабочей поверхности давали 150 мкмоль квантов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$) (33 Вт/ м^2). Культуру выращивали в накопительном режиме на питательной среде RS, приготовленную на стерильной черноморской воде, следующего состава (г/л): NaNO_3 – 0.75, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.0641, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0.386, $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – 0.0872, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.2×10^{-3} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.44×10^{-3} , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.2×10^{-3} , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.36×10^{-3} , $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.12×10^{-3} [17]. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1.5 л воздуха на литр культуры в минуту).

Измерение плотности культуры микроводорослей приводили путем взвешивания сырой массы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках с погрешностью 0.1 мг после осаждения клеток центрифугированием при 1600 g в течение 2 мин. Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали коэффициент связи между сухой и сырой массой ($k = 0.1$) [18].

Fx и Ddx в биомассе *C. closterium* определяли по разработанной нами ранее методике [19]. Коэффициент экстинкции ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) для Ddx в ацетоне принимали равным 2230 мл/($\text{мг} \cdot \text{см}$) при 448 нм

[20], а для фукоксантина в спирте – 1280 мл/($\text{мг} \cdot \text{см}$) при 448 нм [21].

Выделение каротиноидов. Для получения Fx и Ddx в кристаллической форме предварительно проводили трехкратную экстракцию липидов смесью Фолча из 30 г сырой массы *C. closterium* (3 г сухой массы) с концентрацией Fx и Ddx 7 и 1.5 мг/г сухой массы соответственно. При первой экстракции использовали 100 мл смеси Фолча в соотношении спирт-хлороформ 1 : 1. Две последующих экстракции проводили смесью Фолча объемом по 50 мл в соотношении спирт-хлороформ 1 : 2 до полного обесцвечивания биомассы.

Все экстракты объединяли и трехкратно промывали дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 для удаления нелипидных примесей. Хлороформную фракцию упаривали на ротаторном испарителе при температуре 30°C . Концентрат липидов хроматографировали на колонке (диаметр 1.5 см, высота 22 см). В качестве носителя использовали силикагель марки Lachema 100/250 мкм. Элюировали смесью гексан–ацетон в соотношении 7 : 3. Полученную фракцию Fx и Ddx в дальнейшем перекристаллизовывали из смеси диэтилового эфира-гексана или хлористого метилена-гексана. Выделившиеся кристаллы Fx и Ddx промывали гексаном и высушивали в потоке аргона. Было получено 13 мг кристаллического Fx и 2.5 мг кристаллического Ddx, при этом потери Fx при кристаллизации составили 38.1%, а Ddx – 45.5%.

Каротиноиды идентифицировали по известным величинам R_f и спектральным (UV-Vis) характеристикам [20, 22, 23]. Отношение полос поглощения (III/II) для Ddx составляло 90% и совпадало с данными литературы [20]. Кристаллический Fx был также охарактеризован методами ВЭЖХ, масс- и ЯМР-спектроскопии. Изомеры Fx разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-6AD (Shimadzu, Япония), снабженном колонкой длиной 250 мм. Внутренний диаметр колонки 4.6 мм, неподвижная фаза – силикагель, растворитель ацетон-гексан (3 : 7), скорость подачи элюанта 1 мл/мин, регистрация при 450 нм. Спектры протонного магнитного резонанса (HNMR, 500 МГц) снимали на Varian UNITY INOVA 500 (Varian, США) в дейтерохлороформе, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (TMS). Масс-спектры (Fast Atom Bombardment MS) получены на спектрометре JEOL JMS HX 110 Å (JEOL, Япония) на матрице из мета-нитробензилового спирта. На рис. 1а представлены данные препаративного разделения изомеров кристаллического Fx. После перекристаллизации Fx из хлористого метилена-гексана соотношение изомеров составило 99:0.5. Спектр протонного магнитного резонанса кристаллического Fx (рис. 1б) соответствует all-trans Fx, который был описан ранее [24]. Основ-

ные пики масс-спектра: m/z 681.4078 $[M + Na]^+$, m/z 659.4272 $[M + H]^+$, m/z 641.4172 $[MH-18]^+$ идентичны для Fx. Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях (UV-VIS) в метаноле соответствовали all-trans Fx и совпадали с литературными данными [25].

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг проводили в программе Glide [26]. Структура белка HER2 загружена из базы данных RCSB Protein DataBank [27] (номер структуры: 3RCD). Перед проведением расчетов модель белка прошла проверку на наличие ошибок и дефектов с применением модуля Protein PrepWizard [28]. Для исследуемых малых молекул проведена генерация трехмерных координат в силовом поле OPLS3e с использованием модуля LigPrep [28].

Область докинга малых молекул построена на основе центроида координат лиганда в модели белка HER2. Ввиду больших размеров исследуемых лигандов, размер грани кубической области докинга составил 23 ангстрем. Процедура молекулярного докинга проводилась без каких-либо позиционных ограничений. Для каждого лиганда отобраны 20 решений докинга (укладок). Релевантность метода докинга проверена путем повторного докинга контрольного лиганда (представлен в рассматриваемой модели белка HER2) в активную полость. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) лучшей расчетной укладки от данных рентгеноструктурного анализа составило 0.23. Оценка результатов молекулярного докинга проводилась путем сравнения показателей скоринг-функции GlideScore и Emodel.

Клеточные линии. Для экспериментов использованы следующие клеточные линии опухолевых клеток (рак яичников человека): OVCAR5 (CVCL_1628), OVCAR8 (CVCL_1629), KURAMOCHI (CVCL_1345) и OVSANO (CVCL_3114) [https://web.expasy.org/cellosaurus/]. Образцы клеточных линий получены из банка клеток American Type Culture Collection (ATCC), культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе в соответствии с инструкциями поставщика. Культуры клеток выращивали с избытком, с целью оценки уровня заражения микоплазмой с использованием специализированного ПЦР-теста. Используемая среда для культивирования – RPMI (“Lonza”, Швейцария).

Исследование выживаемости. Исследуемые соединения (Fx, Ddx) приготовлены в виде растворов с шестью разными концентрациями: 5, 10, 15, 50, 100 мкМ/л. Каждая концентрация в четырех повторностях. Растворы размещены в 384-луночных планшетах (“Corning”, США) с использованием жидкостного автодозатора Echo 550 (“Labcyte”, США). В качестве негативного контроля использован 0.1% раствор ДМСО и 100 мкМ/л раствор бензетония хлорида соответственно. В

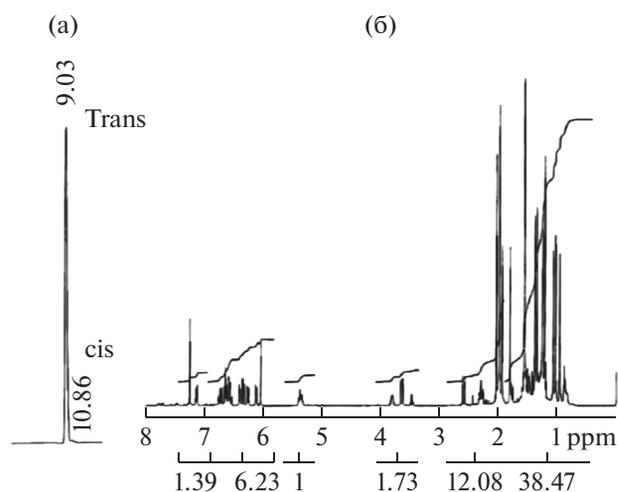


Рис. 1. ВЭЖХ изомеров кристаллического фукоксантина после перекристаллизации фукоксантина из хлористого метилена–гексана (а), спектр протонного магнитного резонанса (¹H NMR) кристаллического фукоксантина (б).

ячейки планшета с растворами Fx и Ddx добавлено по 50 мкл суспензии клеток, что соответствовало плотности 1000 кл. на ячейку. После 72 ч инкубирования проведен анализ выживаемости клеток и цитотоксичности. Реагент CellTiter-Glo (“Promega”, Германия) добавляли по 25 мкл в каждую лунку, люминесценцию регистрировали после 10-минутной выдержки при комнатной температуре с помощью ридера PheraStar (“BMG Labtech”, Германия). Выживаемость клеток рассчитывали путем нормализации позитивного и негативного контролей по следующей формуле:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{CTG}_{\text{drug}} - \text{CTG}_{\text{benz}}}{\text{CTG}_{\text{DMSO}} - \text{CTG}_{\text{benz}}}, \quad (1)$$

где CTG_{drug} – (CellTiter-Glo) интенсивность флуоресценции титрующего агента для клеток под действием исследуемого соединения, CTG_{benz} – уровень флуоресценции положительного контроля (100 мкМ раствор бензетония хлорид), CTG_{DMSO} – соответствующий показатель для негативного контроля (ДМСО).

Все измерения проводили в четырех аналитических повторностях. На рисунках приведены средние значения и среднеквадратическое отклонение. Для расчета доверительных интервалов использовали t-критерий Стьюдента для 95% вероятности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте накопительная культура *C. clostridium* характеризовалась достаточно высокими продукционными показателями. Лаг-фаза практически отсутствовала, экспоненциальная фаза роста длилась 5 сут, стационарная фаза роста – с 5 по 11 сут, после чего культура переходила в фазу отми-

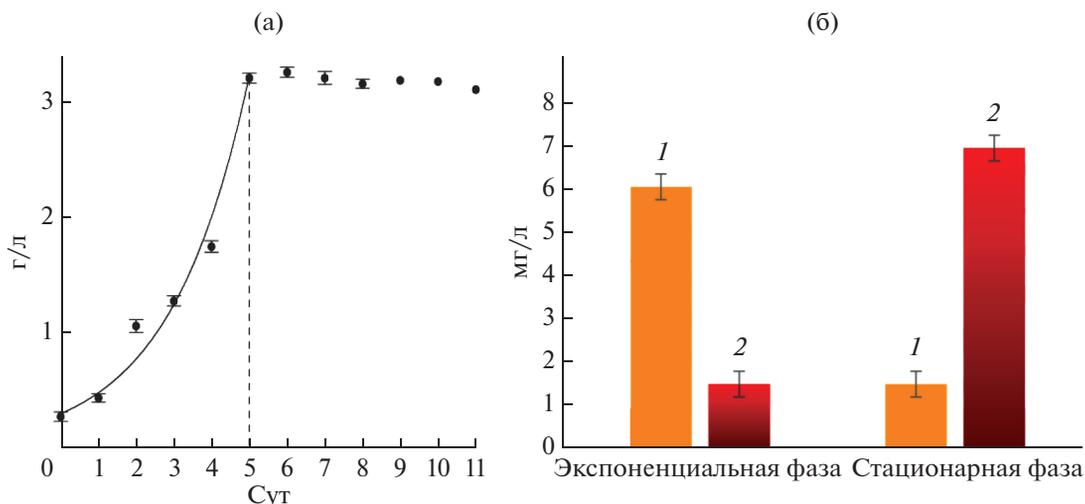


Рис. 2. Динамика плотности накопительной культуры *C. closterium* в эксперименте (а) (линией отмечена аппроксимация данных уравнением (2) в экспоненциальной фазе роста); (б) – концентрация диадиноксантина (1) и фукоксантина (2) в экспоненциальной и стационарной фазах роста.

рания (рис. 2а). В экспоненциальной фазе роста в биомассе *C. closterium* наблюдалось накопление преимущественно Ddx, к концу стационарной фазы роста накапливался Fx (рис. 2б). Средняя скорость биосинтеза Ddx в экспоненциальной фазе роста составила 1.22 мг/(л·сут). За все время накопительного культивирования средняя скорость биосинтеза Fx составила 0.636 мг/(л·сут). Таким образом, очевидно, что получение Ddx на основе накопительной культуры *C. closterium* занимает вдвое меньше времени, чем Fx. Кроме того, поскольку накопление Ddx наблюдалось именно в активно растущей культуре, еще больший выход в единицу времени возможен в проточной культуре, например, хемостате.

Для предельной оценки продуктивности *C. closterium* и скорости биосинтеза Ddx в хемостате аппроксимировали экспериментальные данные методом наименьших квадратов и рассчитали величину удельной скорости роста (μ) в экспоненциальной фазе роста (рис. 2а):

$$B(t) = B_0 \cdot e^{\mu t}; \quad B(t) = 0.3 \cdot e^{0.5t}. \quad (2)$$

где $B_0 = 0.3$ – плотность культуры в момент времени $t_0 = 0$, г/л; $\mu = 0.5$ – удельная скорость роста, 1/сут.

Продуктивность (P) проточной культуры равна:

$$P = \omega \cdot B, \quad (3)$$

где ω – скорость разбавления культуры (удельная скорость протока), 1/сут; B – текущая плотность культуры, которая в свою очередь определяется выражением:

$$B(t) = B_H \cdot e^{(\mu - \omega)(t - t_H)}, \quad (4)$$

где B_H – плотность культуры в момент включения протока t_H .

Из формулы (3) ясно, что продуктивность культуры в хемостате будет тем больше, чем больше величины удельной скорости протока и текущей плотности культуры. Однако эти величины ограничены рабочей областью хемостата: $0 < \omega \leq \mu$ и $B_0 < B_H < B_{\max}$, где B_{\max} – плотность культуры в стационарной фазе роста.

Подставляя (4) в (3), получим:

$$P = \omega \cdot B_H \cdot e^{(\mu - \omega)(t - t_H)}. \quad (5)$$

Из последнего выражения следует, что в рабочей области хемостата максимальная продуктивность будет достигаться в условиях стационарного динамического равновесия при $\omega = \mu$ и $B_H \rightarrow B_{\max}$.

Поскольку в условиях стационарного динамического равновесия рост культуры микроводорослей характеризуется неизменностью биохимического состава биомассы, используя выражение (5), скорость биосинтеза Ddx в хемостате (P_{Ddx}) можно представить как:

$$P_{\text{Ddx}} = \omega \cdot \delta_{\text{Ddx}} \cdot B_H \cdot e^{(\mu - \omega)(t - t_H)}, \quad (6)$$

где δ_{Ddx} – доля Ddx в биомассе *C. closterium*.

Подставив в (6) данные эксперимента ($\omega = 0.5$ 1/сут, $\delta_{\text{Ddx}} = 0.0061$, $B_H = 3$ г/л), получим предельное значение продуктивности Ddx в хемостате для установившегося процесса:

$$P_{\text{Ddx}} = 0.5 \times 0.0061 \times 3 = 9.15 \times 10^{-3} \text{ г/(л} \cdot \text{сут)}.$$

Таким образом, можно видеть, что в проточной культуре скорость биосинтеза Ddx превышает среднюю скорость биосинтеза Ddx в накопительной культуре в 7.5 раз, а Fx – в 14 раз.

В дальнейшем была проведена оценка прооптической активности Ddx и Fx. Эксперименты на клетках, а также анализ тематических публика-

Таблица 1. Основные мишени, рассматриваемые в контексте развития низкомолекулярных индукторов апоптоза

Мишень	Культура клеток	Ссылка
Bcl2	SGC-7901 (рак желудка)	[16]
	HepG2 cancer	[14]
Bcl-xl	human leukemia cell HL-60	[13]
PI3k	human cervical cancer	[12]
	Глиома человека	[12]
Akt	human cervical cancer	[12]
	Глиома человека	[12]
NF-kB	human cervical cancer	[12]
	Глиома человека	[12]

ций показал наличие проапоптотических процессов, индуцируемых Fx и его метаболитами [12–16]. В табл. 1 приведены наиболее значимые мишени, связанные с развитием проапоптотических процессов.

С целью более точного определения потенциальной мишени для исследуемых активных веществ был изучен генетический профиль клеточной культуры OVCAR4 (рак яичников человека https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1628). Анализ генома клеточных культур нормальных клеток яичников и рака яичников проведен с помощью инструмента BioGPS [29], а также базы данных KEGG [30]. Список генов, задействованных в процессе канцерогенеза: 1. BRCA1 (germline mutation/deletion) [HSA:672] [KO:K10605]; 2. BRCA2 (germline mutation/deletion) [HSA:675] [KO:K08775]; 3. MSH2 (germline mutation) [HSA:4436] [KO:K08735]; 4. MLH1 (germline mutation) [HSA:4292] [KO:K08734]; 5. ERBB2 (amplification/overexpression) [HSA:2064] [KO:K05083]; 6. K-ras (mutation) [HSA:3845] [KO:K07827]; 7. AKT2 (amplification) [HSA:208] [KO:K04456]; 8. PIK3CA (amplification) [HSA:5290] [KO:K00922]; 9. c-MYC (overexpression) [HSA:4609] [KO:K04377]; 10. p53 (mutation / deletion, overexpression) [HSA:7157] [KO:K04451].

Ранее упомянутые мишени, к которым селективен Fx и его производные, в данном генетическом профиле отсутствуют. Однако проапоптоти-

ческий эффект есть. Среди перечисленных генов, стоит обратить внимание на ERBB2, кодирующий белок HER2, который наиболее часто связан с развитием рака яичников у человека.

HER2 (англ. human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) — трансмембранный белок, тирозинкиназа, относящаяся к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR/ErbB). Амплификация или повышенная экспрессия гена данного белка играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов злокачественных новообразований, являясь важным биомаркером и терапевтической мишенью.

Анализ структуры белка HER2, имеющейся в базе данных RCSB Protein Data Bank, показал наличие работ, демонстрирующих возможность негативной модуляции активности данного белка с помощью низкомолекулярных агентов [31, 32]. В частности, при рассмотрении трехмерной модели белка HER2 в комплексе с селективным ингибитором TAK-285 (модель 3RCD в Protein Data Bank), нами установлен линейный характер структуры низкомолекулярного ингибитора. В связи с этим, был проведен вычислительный эксперимент по симуляции процесса взаимодействия Ddx и Fx с активной полостью белка HER2.

Оценка сродства малых молекул проведена с помощью метода молекулярного докинга. Рассчитана область потенциального взаимодействия. При этом, размер области связывания выбран в соответствии с геометрией исследуемых лигандов, так как они значительно больше лиганда в активной полости TAK-285. В итоге, получены результаты, которые представлены в табл. 2.

Проведенные расчеты показали, что Ddx парциально имитирует гидрофобное взаимодействие с аминокислотами активной полости белка HER2. Отсутствие ароматического скаффолда в случае рассматриваемого каротиноида приводит к значительной потере гидрофобных контактов. Однако, если обратиться к рис. 4б, то можно увидеть, что основные гидрофобные/полярные/электростатические контакты реализованы аналогично контрольному лиганду. Данный факт позволяет говорить о потенциальной реализуемости специфического взаимодействия с белком HER2. К тому же,

Таблица 2. Показатели расчетного сродства исследуемых соединений в отношении белка HER2

Структура	GlideScore (ккал/моль)	Emodel (ккал/моль)	IC ₅₀ (мкмоль)
Фукоксантин	–7.18	–44.72	18.75
Диадиноксантин	–6.61	–44.61	>100
Контроль (в модели белка HER2)	–9.72	–102.4	0.017

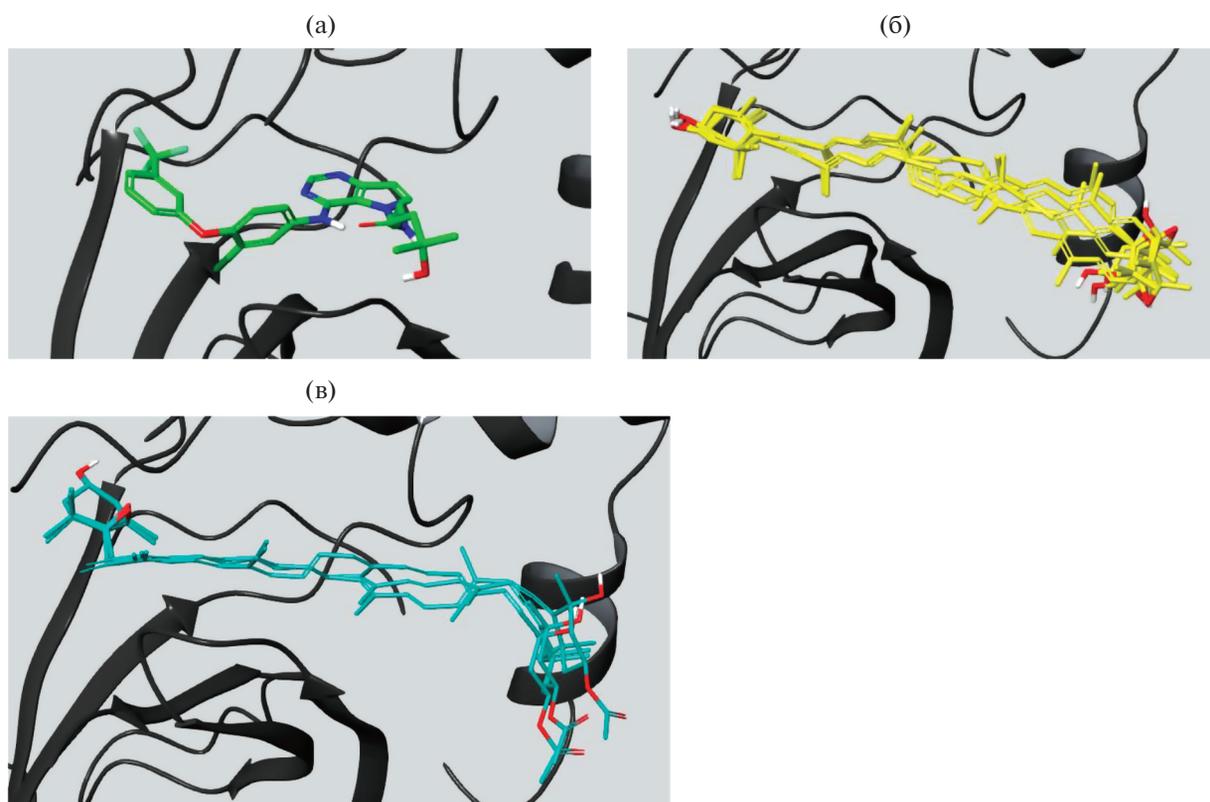


Рис. 3. Укладка исследуемых соединений в активной полости белка HER2: контрольный лиганд TAK-285 (а), диадинноксантин (б), фукоксантин (в).

расчеты показывают достаточно высокий уровень кластеризации решений докинга, что также косвенно говорит о потенциальной сайтоспецифичности взаимодействия (рис. 3б). Аналогично и со структурой Fx. Соединение за счет линейной структуры с сопряженными двойными связями обладает весьма высоким потенциалом гидрофобного взаимодействия, за счет чего довольно эффективно оккупирует активную полость HER2. Тем не менее, отсутствие ароматических мотивов в структуре снижает сайтоспецифичность взаимодействия (рис. 4).

Результаты расчетов показали, что в сравнении с референсной структурой TAK-285 Fx и Ddx обладают более низкими показателями активности. Рассматривая величину GlideScore как аналог свободной энергии Гиббса (ΔG) можно утверждать, что расчетная константа ингибирования различается примерно на три порядка ($1000\times$). Данные результаты согласуются с экспериментальным уровнем активности: $\Delta\text{GlideScore (Ddx)} = 3.11$; $\text{IC}_{50 \text{ Ddx/peф}} = 5882.35$; $\Delta\text{GlideScore (Fx)} = 2.54$, $\text{IC}_{50 \text{ Fx/peф}} = 1102.94$.

Проведенный нами эксперимент по изучению цитостатического эффекта Ddx и Fx с культурами клеток OVCAR5, OVCAR8, KURAMOCHI и

OVSANO (Серозная аденокарцинома яичников с вариантами мутаций в ERBB2/p53/KRAS) показал, что для соединения Ddx величина IC_{50} достигалась при концентрации >100 мкМ (рис. 5а).

Результаты анализа жизнеспособности клеточных линий рака яичников показали, что Fx проявлял цитостатическое действие с IC_{50} в пределах 18.75 мкМ (рис. 5б). Этот эффект воспроизводился во всех протестированных клеточных линиях. Ddx снижал жизнеспособность клеток на 40% только при наивысшей протестированной концентрации (100 мкМ). В то время как эффект от воздействия Fx более выражен уже в диапазоне физиологических концентраций, а токсический ответ был достигнут при концентрации 18.75 мкМ. Клеточная линия OVCAR4 показала самую высокую чувствительность к Fx и Ddx среди протестированных клеточных линий (рис. 5б).

На основании полученных результатов можно предположить, что в случае применения Ddx, цитостатический эффект достигался за счет подавления активности гиперэкспрессированного белка HER2, отвечающего за рост клеток. Стоит также отметить, что гиперэкспрессированный HER2 ответственен за резистентность к химиотерапии опухолевых клеток [33]. Селективное взаимодей-

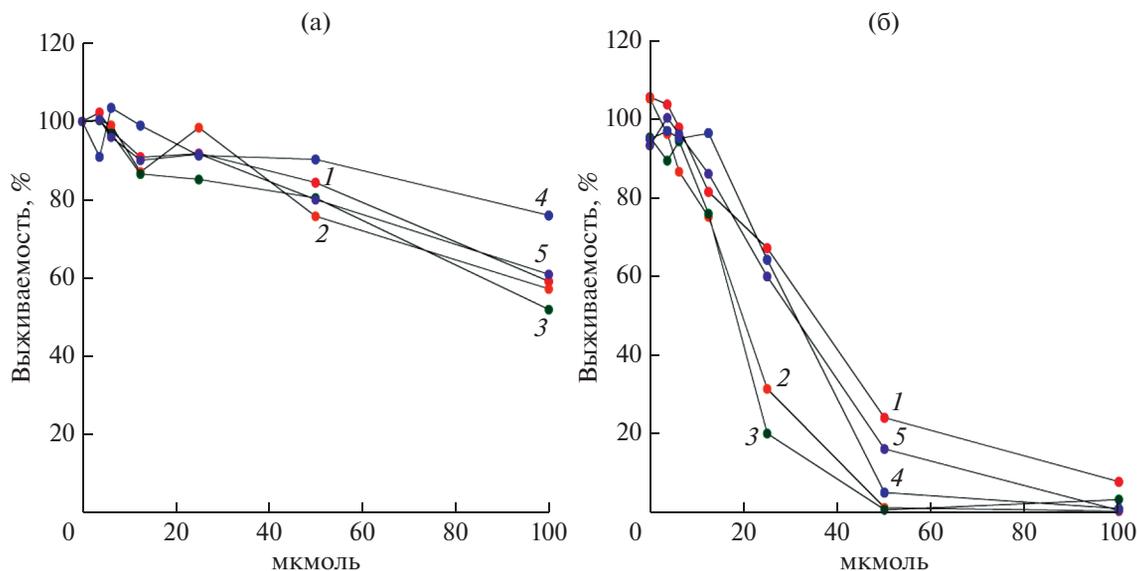


Рис. 5. Цитостатический эффект диадиноксантина (а) и фукоксантина (б) на клеточных линиях: 1 – KURAMOCHI; 2 – HEK293; 3 – OVCAR4; 4 – OVCAR8; 5 – OVSAHO.

соответствует 0.07 г сухой биомассы *C. closterium*. Если в качестве профилактики использовать Ddx, как альтернативу Fx, то, учитывая более низкую активность Ddx, потребуется минимум 0.33 г сухой биомассы *C. closterium* в сутки.

Авторы выражают благодарность Акимову Е.А. (Institute for Molecular Medicine Finland, HiLIFE) и доктору философии Т. Маока (Research Institute for Production Development, Киото, Япония) за помощь в экспериментальной работе с клеточными культурами и идентификации каротиноидов.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по теме “Исследование механизмов управления производственными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” (№ госрегистрации 121030300149-0) и госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках проекта по созданию и развитию научно-исследовательских центров мирового уровня “Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение” (№ госрегистрации 075-15-2020-926).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De la Cuesta J.L., Manley S.L. // *Limnol. and Oceanogr.* 2009. V. 54. P. 1653–1664. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.5.1653>
2. Wang Z., Li H., Dong M., Zhu P., Cai Y. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2019. V. 145. № 2. P. 293–301. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02841-2>
3. Wang C., Chen X., Nakamura Y., Yu C., Qi H. // *Food & Function.* 2020. V. 11. № 11. P. 9338–9358. <https://doi.org/10.1039/d0fo02176h>
4. Méresse S., Fodil M., Fleury F., Chénais B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. P. 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21239273>
5. Jaswir I., Noviendri D., Taher M., Mohamed F., Octavianti F., Lestari W. et al. // *Molecules.* 2019. V. 24. № 5. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24050947>
6. Satomi Y. // *Anticancer Res.* 2017. V. 37. № 4. P. 1557–1562. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11484>
7. Kumar S.R., Hosokawa M., Miyashita K. // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11. P. 5130–5147. <https://doi.org/10.3390/md11125130>
8. Геворгуз П.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Пенков А.П., Лелеков А.С. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2016. Т. 1. С. 73–77.
9. Lu X., Sun H., Zhao W., Cheng K.-W., Chen F., Liu B. // *Mar. Drugs.* 2018. V. 16. № 7. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/md16070219>
10. Kuczynska P., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K. // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13. № 9. P. 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
11. Guo B., Liu B., Yang B., Sun P., Lu X., Liu J. et al. // *Mar. Drugs.* 2016. V. 14. № 7. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/md14070125>
12. Jin, Y., Qiu S., Shao N., Zheng J. // *Med. Sci. Monit.* 2018. V. 24. P. 11–18. <https://doi.org/10.12659/MSM.905360>
13. Kim K.N., Heo S.J., Kang S.M., Ahn G., Jeon Y.J. // *Toxicol. in Vitro.* 2010. V. 24. № 6. P. 1648–1654. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.023>
14. Foo S.C., Yusoff F.M., Imam M.U., Foo J.B., Ismail N., Azmi N.H. et al. // *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2019.

- V. 21. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00296>
15. Wu H.L., Fu X.Y., Cao W.Q., Xiang W.Z., Hou Y.J., Ma J.K. et al. // J. Agric. Food Chem. 2019. V. 67. № 8. P. 2212–2219.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07126>
 16. Zhu Y., Cheng J., Min Z., Yin T., Zhang R., Zhang W. et al. // J. Cell Biochem. 2018. V. 119(9). P. 7274–7284.
<https://doi.org/10.1002/jcb.27022>
 17. Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Бобко Н.И., Лелеков А.С. // Актуальная биотехнология. 2015. Т. 14. № 3. С. 46–48.
 18. Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5. № 1. С. 201–207.
 19. Рябушко В.И., Железнова С.Н., Нехорошев М.В. // Альгология, 2017. Т. 27(1) С. 15–21.
<https://doi.org/10.15407/alg27.01.015>
 20. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. // JMBA. 1997. V. 77(3). 661 p.
<https://doi.org/10.1017/S0025315400036389>
 21. Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S.K., Mizuno M., Yoshimura K. et al. // BJN. 2009. V. 102. № 2. P. 242–248.
<https://doi.org/10.1017/S0007114508199007>
 22. Whittle S.J., Casselton P.J. // Br. Phycol. J. 1975. V. 10. № 2. P. 192–204.
<https://doi.org/10.1080/00071617500650181>
 23. Kuczynska P., Jemiola-Rzeminska M.I. // Appl. Phycol. 2017. V. 29. P. 79–87.
<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0961-x>
 24. Englert G., Biornland T., Liaaen-Jensen S. // Magnetic Resonance in Chemistry. 1990. V. 28. № 6. P. 519–528.
<https://doi.org/10.1002/mrc.1260280610>
 25. Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Funayama K., Miyashita K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 332. № 2. P. 392–397.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.002>
 26. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T. et al. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. № 7. P. 1739–1749.
<https://doi.org/10.1021/jm0306430>
 27. Burley S.K., Berman H.M., Bhikadiya C., Bi C., Chen L., Di Costanzo L. et al. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. (Database issue), D464–D474.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>
 28. Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman, W. // J. Comput Aided Mol. Des. 2013. V. 27. № 3. P. 221–234.
<https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
 29. Wu C., Jin X., Tsueng G., Afrasiabi C., Su A.I. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. (D1). P. 313–316.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1104>
 30. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. (D1). P. 457–462.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
 31. Rampogu S., Son M., Baek A., Park C., Rana R. M., Saravanan A.Z. et al. // Computational Biology and Chemistry 2018. V. 74. P. 327–338.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.04.002>
 32. Yoshioka T, Shien K, Namba K, Torigoe H., Sato H., Tomida S. et al. // Cancer Sci. 2018. V. 109. № 4. P. 1166–1176.
<https://doi.org/10.1111/cas.13546>
 33. Harris F.R., Zhang P., Yang L., Hou X., Leventakos K., Weroha S.J. et al. // Mol. Oncol. 2019. V. 13. № 2. P. 132–152.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12414>

Production of Diadinoxanthin in Intensive Culture of the Diatomaceous Alga *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. and Its Pro-Apoptotic Activity

R. G. Gevorgiz^{a,*}, M. A. Gureev^{b,**}, S. N. Zheleznova^a, E. V. Gureeva^a, and M. V. Nechoroshev^a

^a A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol, 299011 Russia

^b Research Center “Digital biodesign and personalized healthcare”, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru

**e-mail: max_technik@mail.ru

In this study, we estimate the production of diadinoxanthin and its cytostatic activity in an intensive culture of *C. closterium* by molecular modeling and experiments with human tumor cell cultures OVCAR5, OVCAR8, KURAMOCHI and OVSAHO. According to the data of both the simulation and experiments with the cell cultures, diadinoxanthin demonstrates lower activity (by a factor of more than 4) in comparison with fucoxanthin. The IC₅₀ value for diadinoxanthin is achieved at a concentration of above 100 μM, while fucoxanthin exhibits a cytostatic effect below 18.75 μM. In a flow-through culture of *C. closterium*, the production of diadinoxanthin can exceed the production of fucoxanthin by 14 times, which can make a technology for its production less expensive and significantly reduce the cost of therapeutic and prophylactic drugs based on microalgae.

Keywords: marine microalgae, carotenoids, *Cylindrotheca closterium*, molecular docking, ovarian cancer, antitumor activity