

На правах рукописи



ГОРШУНОВА СОФЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**НОВЫЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И
УСТАНОВЛЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Саратов – 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Растущее население мира требует новых технологий, чтобы прокормить всех, поэтому в мире растет потребность в технологиях, которые могут заменить традиционные методы увеличения производства в сельском хозяйстве. В последнее время нанотехнологии рассматриваются как многообещающий и формирующийся подход к внедрению в сельское хозяйство для повышения продуктивности различных культур путем введения наночастиц при обработке семян, внекорневых опрыскиваниях растений, наноудобрениях для сбалансированного питания сельскохозяйственных культур, наногербицидах для эффективной борьбы с сорняками, наноинсектицидах для защиты растений, ранних обнаружений болезней растений и дефицита питательных веществ с помощью диагностических наборов и наноферомонов для эффективного мониторинга вредителей. Так же нанотехнологии с каждым днем находят все большее применение в интенсификации животноводства. Кроме того, отдельные наночастицы с уникальными физико-химическими и биологическими свойствами используются в сельском хозяйстве для увеличения процента всхожести семян, что является начальным шагом к повышению урожайности сельскохозяйственных культур. В контексте сельскохозяйственных культур наночастицы оказывают как положительное влияние на параметры качества семян, такие как процент всхожести, длина проростков, сухая масса проростков и показатели жизнеспособности, так и негативное воздействие, вызывая токсичность для окружающей среды (Singh, Bhuker, Jeevanadam, 2021).

Селен - микроэлемент, по своей химической природе относящийся к группе неметаллов. Поступая с пищей в неактивной форме, он проходит ряд метаболических преобразований и вместе с белками образует селенопротеины, играющие важную роль в поддержании гомеостаза. Наночастицы являются перспективным поставщиком биологически активных веществ в организм животных и человека, а селен незаменим для жизнедеятельности млекопитающих (Effect of selenium..., 2006; Selenium and vitamins..., 2006). Многие заболевания у человека связаны с недостатком данного микроэлемента, в том числе установлена прямая связь микроэлемента и гепатита С (Doraiswamy, Xiong, 2006), выявлена связь между селеном и диабетом (Vahidi, 2020), в так же ряда сердечно-сосудистых заболеваний (Selenoprotein deficiency..., 2006). В литературе приводятся данные о связи данного микроэлемента с такими заболеваниями как: Альцгеймер (Doraiswamy, Xiong, 2006; Schrauzer, 2006), рак (Biological levels..., 2005; Hemolysate thioredoxin..., 2006; Selenoprotein deficiency accelerates..., 2006; Schrauzer, 2006; Vahidi, Barabadi, Saravanan, 2020), астма (Wu, 2004), цереброваскулярной – недостаточности (Lower antioxidant, 2005). Стоит отметить связь между данным микроэлементом и способностью снижать степень тяжести отравления тяжелыми металлами (The roles..., 2006; The Seleno Bis..., 2006), причем отмечается действие не за счет образования и связывания тяжелых металлов в какой-либо комплекс, а усиление данным микроэлементом защитных функций организма, что подтверждается низкими концентрациями селеносодержащих добавок, оказывающих положительное влияние. Особое внимание вызывает возможность положительного влияния данного микроэлемента при заболеваниях щитовидной железы (The Effects of..., 2012).

Выявлено, что наночастицы селена обладают высокой био-усвояемостью, при этом более низкой токсичностью, чем другие неорганические аналоги (The Effects of..., 2012; Effects of Different..., 2019).

В литературе показано, что нанокompозиты элементного селена обладают противоопухолевым действием с накоплением в ядре опухолевой клетки, в частности, на карциноме Эрлиха. Также известно, что наночастицы селена показывают свою высокую противоопухолевую активность, и они могут выступать в комбинации с другими агентами для химиотерапии рака. Подтверждены некоторые механизмы противоопухолевой активности. Показано, что противоопухолевые эффекты наночастиц (Se) опосредованы их возможностью ингибировать рост раковых клеток при помощи индукции остановки клеточного цикла, индукции апоптоза, активации аутофагии. Кроме оригинальной противораковой эффективности, наночастицы селена обеспечивают наилучшую селективность между обычными и раковыми клетками (Юркова, Омельченко, 2015). Соединения селена хорошо зарекомендовали себя в качестве редокс-модуляторов с антиоксидантными, а также прооксидантными свойствами, обладают высокой специфичностью в отношении раковых клеток с точки зрения клеточного поглощения, а также локализации накопления в раковых клетках. Так же отмечается, что снижение работоспособности, эмоциональная нестабильность, нервозность, снижение активности иммунитета, неэффективность приема иммуностимуляторов и витаминов являются первыми признаками нехватки селена в организме человека. Последствиями недостатка селена в организме могут стать: заболевания сердца, ожирение, нарушение зрения, атеросклероз, замедление метаболизма, нарушение функции печени, рассеянный склероз, болезни поджелудочной железы, бесплодие. У животных к числу обусловленных дефицитом заболеваний, в которых может играть определенную роль селен, относятся мышечная дистрофия у овец и коров, экссудативный диатез у цыплят и некроз печени у свиней и крыс. Признаки специфичные для дефицита селена в отсутствие витамина E, включают дегенерацию поджелудочной железы у цыплят, а также плохой рост, репродуктивную недостаточность, сосудистые изменения и катаракты у крыс дефицит селена в природе приводит к множеству различных заболеваний из-за снижения иммунитета. При селеновой недостаточности снижается репродуктивная функция, замедляется рост животных. При недостатке селена в организме нарушаются липидный, углеводный и жировой обмен (Барабой, 2004). Установлено, если в организме содержание селена недостаточно, то это может привести к возникновению и размножению атипичных клеток и онкологии. Если в организм ввести достаточное количество селена, то ферменты успевают эту атипичную клетку вычислить и уничтожить. То есть, они не только препятствуют образованию этих клеток, но и уничтожают уже образовавшиеся. Такое положительное воздействие селен оказывает при всех опухолевых процессах, в том числе при заболеваниях крови и различных доброкачественных новообразованиях (Валуева, Боровикова, Киппер, 2008; Перспектива использования..., 2014; Пат. 2572716 РФ..., 2016).

А нанотехнологии имеют дело с субмикроскопическими частицами, по крайней мере, с одним измерением менее 100 нм. В качестве успешных терапевтических агентов и носителей лекарств, в практике используются различные

наноструктуры, включая полимеры, липосомы, наночастицы (Ag, Au, Ce, Cu, Eu, Fe, Se, Ti, Y) и другие варианты (Multifunctional inorganic..., 2015). Уникальные особенности наночастиц, такие как небольшой размер, высокая площадь поверхности, заряд поверхности, растворимость и многофункциональность, успешно доказывают свою возможность использования в качестве носителей терапевтических молекул. Наночастицы решают многие биофармацевтические и фармакокинетические проблемы, связанные со многими препаратами в различных классах заболеваний, они повышают терапевтическую эффективность ионизированных препаратов; улучшают проникновение водорастворимых соединений, белков, пептидов, вакцин, миРНК, ДНК и других биологических терапевтических препаратов. Поверхностная модификация наночастиц с целевыми лигандами делает систему доставки лекарств гораздо универсальной и может избирательно доставлять к целевому объекту (Sperling, Parak, 2010).

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время для восполнения дефицита селена в основном используются его неорганические соединения (The See Kidney..., 2016) или продукты переработки селенита натрия *Saccharomyces Cerevisiae* (Fisinin, Papazyan, Surai, 2009). Исследование биологической активности органических соединений селена и использование последних для получения биологических форм селеносодержащих соединений интенсивно ведутся в последние 10-15 лет (Recent advances..., 2017; Repair of..., 2017; Tsvileva, Perfilova, 2017). Одним из актуальных направлений является синтез наночастиц содержащих селен и исследование их биологической активности, как для восполнения дефицита микроэлемента так и для лечения заболеваний различной этиологии и стимуляции живых организмов, однако на данный момент времени в мире нет препаратов, включающих в свой состав наночастиц или используемых в сельском хозяйстве, однако большое количество публикаций в данной области показывает высокий интерес и возможную практическую значимость данных исследований. В этой связи выбор темы работы был обусловлен актуальностью данных исследований и недостаточностью сведений как по методам синтеза, так и биологической активности наночастиц селена.

Цель работы состояла в разработке метода синтеза наночастиц селена стабилизированных различными ПАВ и исследования их биологических свойств для дальнейших перспектив использования в сельском хозяйстве, в частности, в качестве адъювантов для вакцин, ростстимулирующих средств для растений и противоопухолевых препаратов.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику получения наночастиц из заранее синтезированного мало стабильного продукта (соединения), что позволит проводить синтез наночастиц селена в более «мягких» условиях.
2. Установить размер наночастиц селена с помощью электронной микроскопии и динамического рассеяния света.
3. Исследовать способность наночастиц селена в модельных испытаниях на противоопухолевую активность.
4. Установить возможность использования наночастиц селена как адъюванта для вакцин.

5. Разработать водорастворимую рецептуру с селеном для восстановления гепатобилиарной системы организма.

6. Установить ростстимулирующее действие наночастиц на всхожесть семян.

Научная новизна работы

Впервые разработан новый метод синтеза наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида размером в 2-4 нм. Исследованы возможности получения наночастиц селена различного размера в зависимости от использования различных поверхностноактивных веществ, в частности Кремофора А-25, TWEEN 80, поливинилпирролидона, а также хитозана и сахарозы.

Разработаны методы анализа наночастиц селена с использованием динамического рассеяния света и проведена их корреляция с электронной просвечивающей микроскопией. Исследованы размеры наночастиц селена в зависимости от используемых поверхностноактивных веществ. Установлена острая токсичность, местнораздражающее действие, онкопротекторные свойства наночастиц активность на примере клеточной линии EPNT-5, наночастиц селена, а также исследована возможность использования наночастиц селена в качестве адьюванта для вакцин в рамках протективной активности на примере вакцины от бешенства. Исследована возможность повышения стрессоустойчивости и всхожести семян.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в том, что установлена возможность получения наночастиц селена из селеноорганических соединений в «мягких» условиях со стабилизацией поверхностно активными веществами, установлен размер частиц методом просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света и проведена корреляция между двумя данными методами анализа. Практическая значимость работы состоит в проведённых основных доклинических исследованиях данных наночастиц и исследованиях по возможности использования их в качестве адьюванта для вакцин, противоопухолевых препаратов и ростостимулирующих добавок. Таким образом показана возможность использования наночастиц селена как в ветеринарии, так и в агрономии. В работе представлены оригинальные методы синтеза наночастиц и показана зависимость размера с оболочкой в зависимости от используемого растворителя что дает более полное представление не только о самой наночастице, но и ее нахождение в растворах.

Разработана оригинальная рецептура мицеллярного раствора для восстановления гепатобилиарной системы организма млекопитающих, включающая в свой состав селен, фосфотидилхолин, метионин, витамин Е и сопутствующие вещества, получен патент на изобретение.

Результаты исследований внедрены в ветеринарную практику АО "УЧХОЗ "Муммовское" Мсха имени К.А. Тимирязева", акт о внедрении от 06.04.2021г., используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО «Вавиловский университет».

Методология и методы исследования

Методология данного научного исследования заключалась в поиске оптимальных соединений в качестве поставщика селена в наночастицы, которые смогут в растворах самопроизвольно образовывать элементарный селен, накопление статистических данных о размере получаемых наночастиц как самого ядра селена, так и совместно с оболочкой в различных растворителях разными методами анализа. Проведение исследований на растениях и животных для определения возможности использования данных наночастиц в сельском хозяйстве.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Разработан новый метод синтеза из дихлордиацетофенонилселенида и диацетофенонилселенида для получения наночастиц селена размером 2-6 нм.
2. Наночастицы селена, способны снижать вероятность развития опухолей на примере EPNT-5 на 80%.
3. Адьювантные свойства наночастиц селена позволяют повысить индекс иммуногенности вакцины «Рабикан» на 19 %.
4. Для восстановления гепатобиллиарной системы разработана новая рецептура на основе селена, фосфотидилхолина, витамина Е и метионина.
5. Наночастицы селена размером 2-6 нм повышают всхожесть семян на 91% на примере яровой ржи.

Работа выполнена на кафедре «Микробиология и биотехнология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов подтверждена значительным объемом экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики.

Материалы диссертации были представлены на: конкурсе «УМНИК» в Фонде содействия инновациям (Саратов, 2021); Конкурсе «Молодой ученый», Бирюч Инновационный центр (Бирюч, 2023); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения» (Саратов, 2021); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения» (Саратов, 2022); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения» (Саратов, 2023); Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2020-2021 год (Саратов, 2021-2022); V Международной конференции «Биотехнологии – драйвер развития территорий» (Вологда, 2023).

Публикации

Основные результаты отражены в 17 публикациях, из них 2 статьи в журнале, входящие в международную наукометрическую базу Scopus и Web of Science, 1 патент РФ.

Личный вклад соискателя состоит в обсуждении цели и задач исследования, выборе и обосновании методик эксперимента, непосредственном его проведении. Автор активно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, установлении закономерностей и формулировке выводов, написании статей и заявки на патент, подготовке и представлении докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 228 наименований, в том числе 222 иностранных научных работ, и приложений. Работа представлена на 194 страницах и иллюстрирована 85 рисунками и 28 таблицами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Данные периодической печати показывают, что селен является незаменимым микроэлементом, который задействован в метаболизме человека и животных и обладает антиоксидантной активностью. Так же в печати есть данные о наночастицах селена, которые получают различными методами и обладают высокой биологической активностью. Стоит отметить, что наночастицы показывают высокие перспективы своего применения в широком спектре областей.

Синтез селеноорганических соединений

В рамках задачи, состоящей в поиске нового метода синтеза наночастиц селена, исключающего применение сильных восстановителей, окислителей, сильно щелочных или кислых сред и температурного режима близкого к нормальным условиям, что обуславливалось необходимостью в дальнейшем стабилизировать наночастицы мало стабильными веществами, в частности, белками и/или их фрагментами, нами был проведен поиск возможных соединений, содержащих селен, которые могли бы служить донором данного элемента. Из литературных данных известно, что основным поставщиком селена для синтеза наночастиц является селенистая кислота или ее соли, однако, использование такой сильной кислоты является неприемлемым для нашей задачи, и, как и соли для получения элементарного селена, необходимо использование сильных восстановителей, как например гидразин. Поэтому нами было решено использовать селеноорганические соединения, которые, конечно же, обладают большей себестоимостью, однако могут являться менее термостабильными и расщепляться в более приемлемых условиях.

Установлено, что диацетофенонилселенид позволяет, в относительно «мягких» условиях проводить синтез наночастиц селена. Однако для дальнейшей оптимизации синтеза нами был рассмотрен дихлордиацетофенонилселенид, который в отличии от диацетофенонилселенида, как оказалось, обладает еще меньшей стабильностью и поэтому не представляет особого интереса со стороны его применения, однако при наших целях является более перспективным, кроме того он обладает максимально низкой себестоимостью производства, за счет получения в одну стадию с высокими выходами в реакции ацетофенона с селенистой кислотой в присутствии соляной кислоты. Синтез дихлордиацетофенонилселенида и диацетофенонилселенида осуществлялся в условиях кислотного катализа с использованием селенистой кислоты и ацетофенона, непосредственно перед получением наночастиц из данных веществ.

Синтез наночастиц из дихлордиацетофенонилселенида

Особенностью синтеза наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинилпирролидоном заключалась в создании

щелочной среды. Находясь в подобной среде, происходит разложение 1,5 дикетонов, представителем которых является дихлордиацетофенонилселенид с выделением селена, который стабилизируется поверхностно-активным веществом растворённым в среде. В результате получался порошок бледно-желтого цвета. Определение размера наночастиц на просвечивающем электронном микроскопе показало частицы в диапазоне 2-4 нм (Рисунок 1).

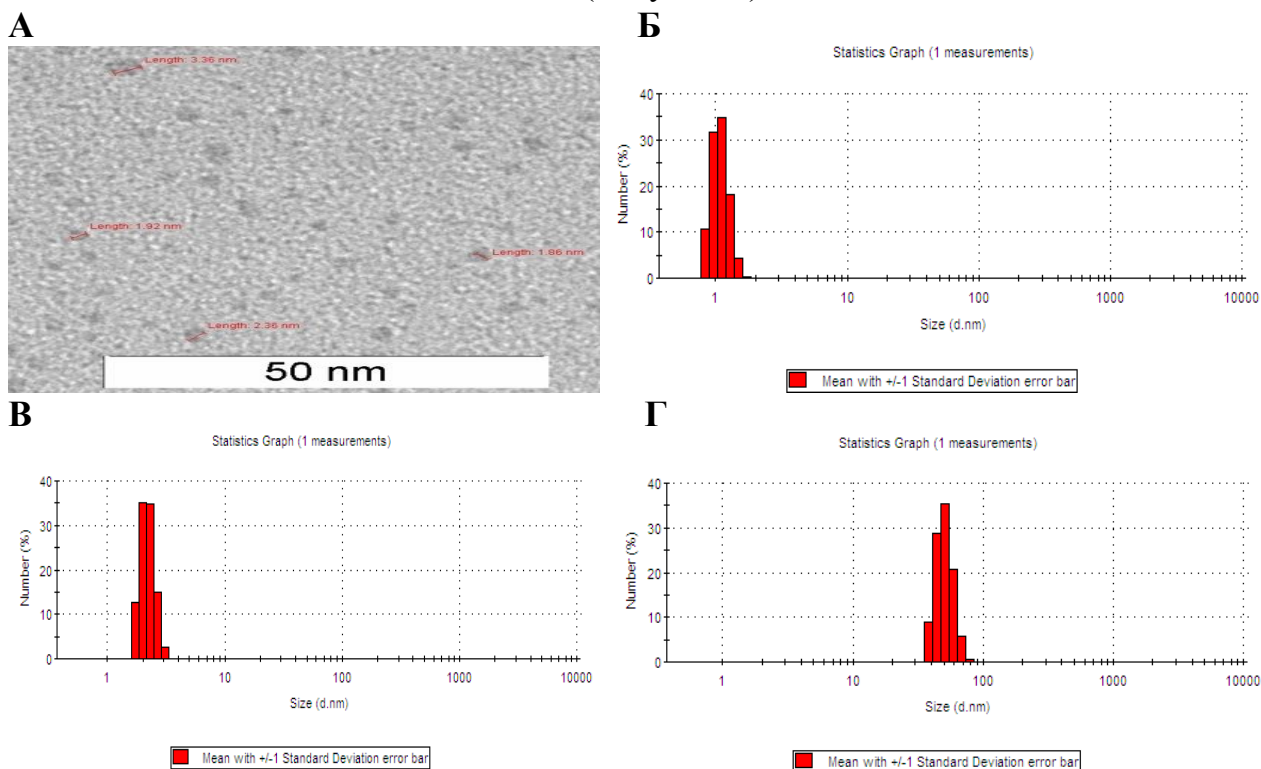


Рисунок 1 – Наночастицы селена стабилизированные поливинилпирролидоном: А – электронно-микроскопические данные; Б – ДРС раствора 0,1 мг/мл; В – ДРС раствора с концентрацией 0,0001 мг/мл; Г – ДРС раствора с концентрацией 0,001 мг/мл

Данные наночастицы стабильны в водных растворах с максимальной концентрацией 0,12 г/мл. В растворенном виде представляет собой прозрачную жидкость с бледно-жёлтым оттенком, без внутренних вкраплений, что является удобным как для перорального, так и для парентерального введения. Для исследования размера наночастиц селена методом динамического рассеяния света (ДРС) необходимо было выбрать оптимальные концентрации для анализа, так как данный метод сочетает в себе как физический анализ образца, так и математическое моделирование, так как используется в расчете размера частиц уравнение Эйнштейна-Стокса и корреляция вязкости, движения частиц и их размера. В концентрации 0,1 мг/мл раствор наночастиц показал средний размер 1,08 нм, а при концентрации 0,001 мг/мл – 49,93 нм, однако, при понижении концентрации до 0,0001 мг/мл средний размер изменился до 2,20 нм. Таким образом установлено, что для оптимального установления размера данных наночастиц селена необходимо проводить анализ в интервале концентраций от 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл, в меньшей или большей концентрации данный метод анализа не дает достоверные результаты. В дальнейшем при исследовании наночастиц селена нами использовались концентрации от 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл при анализе методом ДРС в воде (Рисунок 1).

Наночастицы селена в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 0,01 мг/мл показали средний размер 263,29 нм. В результате проведенных исследований установлено, что наночастицы селена в воде при концентрации 0,1 мг/мл и более показывает статистическую ошибку при обработке результатов и размер от 0,8 до 2 нм, что не коррелируется с данными полученными нами ранее при проведении исследований данного образца с использованием электронной микроскопии, при разбавлении раствора до концентрации 0,0001 мг/мл наблюдается аналогичный результат, что связано с превалированием шумов над аналитическим сигналом. При этом в концентрации 0,001 мг/мл размер наночастиц составлял от 37 до 68 нм, а в диметилсульфоксиде размер частиц составлял от 190 до 396 нм, таким образом нами установлено, что в диметилсульфоксиде наблюдается аналогичная воде зависимость достоверных результатов от концентрации, при этом стоит отметить, что в одинаковых концентрациях в зависимости от используемого растворителя наблюдается различие в размере одинаковых наночастиц, что может служить доказательством того, что наночастицы совместно со своей оболочкой образуют динамичную систему меняющую свой размер в зависимости от диэлектрической силы раствора и других физико-химических свойств растворителя. Учитывая, что литературные данные свидетельствуют о том, что биологическая активность наночастиц селена находится в зависимости от их размера, целесообразно проводить сравнительное изучение размера частиц в растворах максимально приближенных к физиологическим для установления размера частиц, которые и оказывают необходимое и регистрируемое влияние на биологический объект. Основным методом анализа наночастиц на данный момент времени является электронная-микроскопия, которая дает максимально достоверный результат по определению размера наночастиц, однако, данный метод не позволяет определить размер частиц с их оболочкой и особо не дает представления о размере частиц в растворе и влиянии растворителя на их размер.

Таким образом, нами установлено образование наночастиц селена размером 2-4 нм при использовании дихлордиацетофенонилселенида и поливинилпирролидона.

Так же была разработана методика синтеза наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида со стабилизацией данных наночастиц с помощью поверхностно активного вещества Кремофор А-25. В данной методике мы использовали дихлордиацетофенонилселенид, дистиллированную воду, ПАВ - Кремофор А-25, бензол, аммиак.

Данная реакция проводилась при 60°C и было установлено образование осадка, который свидетельствует о выпадении элементарного селена, а при перемешивании и температуре 24°C было установлено образование наночастиц и определен размер наночастиц на просвечивающем электронном микроскопе, где показало частицы в диапазоне от 16 до 30 нм, средний размер наночастиц селена при измерении ДРС показал 9,86 нм, где размер наночастиц составлял от 6 до 18,2 нм. Таким образом установлено, что наночастицы селена из дихлордиацетофенонилселенида возможно получать только при комнатной или пониженной температуре при стабилизации Кремофора А-25 и в среде аммиака, при повышенной температуре наиболее вероятно из-за слишком быстрой скорости

реакции образуются микро и макрочастицы селена, что не позволяет получать стабильные наночастицы.

В литературных данных приводился ряд экспериментов, в которых использовалась аскорбиновая кислота, данный эксперимент позволил изучить возможность получения наночастиц в кислой среде из дихлордиацетофенонилселенида при температуре 24°C в присутствии Кремофор А-25 и показал, что данная реакция приводит к образованию прозрачного раствора без осадка. Сразу же после перемешивания синтез приобретает красноватый оттенок. Без перемешивания наблюдалась прозрачная жидкость без осадка с розовым оттенком. При перемешивании наблюдалась прозрачная жидкость оранжевого цвета, также без выпадения осадка.

Спустя 7 суток выдержку при перемешивании и без перемешивания наблюдалась неоднородная прозрачная жидкость оранжевого цвета без осадка.

Методом ДРС было установлено, что наночастицы обладают размером от 43 до 220,2 нм, а средний размер 72,34 нм. Большой разброс в размерах показывает невозможность использования аскорбиновой кислоты для получения наночастиц и вероятно отсутствие перспективы использования веществ, смещающих РН в кислую среду.

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида

Проведены синтезы наночастиц селена из диацетофенонилселенида стабилизированные хитозаном, поливинилпирролидоном, Кремофором А-25, TWEEN 80 и сахарозой.

Получение наночастиц селена стабилизированных хитозаном проводили в аналогичных условиях в реакции диацетофенонилселенида щелочной среде, происходило выделение селена, который стабилизировался хитозаном растворённом в среде. В результате получалась после лиофильного высушивания масса, которая при измельчении в порошок обладала светлым цветом и являлась водорастворимой, с максимальной концентрацией в воде 0,2 г/мл, которая являлась мутной бледно-желтой однородной жидкостью. Данная форма является удобной как для перорального, так и для парентерального введения. Определение размера наночастиц на просвечивающем электронном микроскопе показало частицы в диапазоне от 4 до 6 нм.

При исследовании размера наночастиц с помощью динамического рассеяния света было установлено, что размер составляет в интервале от 43 до 255 нм, средний размер составил 71,51 нм, в основном различие полученных результатов ДРС от электронной микроскопии в методе анализа возможно объяснить тем, что электронная микроскопия детектирует саму наночастицу селена, а ДРС измеряет размер частицы в растворе вместе с хитозаном, покрывающим данную наночастицу, так как данный полимер имеет достаточно большой размер и возможно образование комплексов данных наночастиц связанных между собой Ван-дер-Ваальсовыми силами, которые могут связывать между собой полимерные молекулы хитозана в достаточно стабильную систему, которая и фиксировалась при ДРС.

Для исследования возможности получения большего размера наночастиц селена стабилизированных поливинилпирролидоном нами был осуществлен аналогичный синтез с добавлением к раствору диацетофенонилселенида и поливинилпирролидона аммиака, однако данные ДРС свидетельствовали об

неоднородности размера наночастиц селена получаемых в данном синтезе и имели размер в интервале от 43 до 342 нм, средний размер 80,27 нм.

Так как нами была установлена возможность стабилизации наночастиц аминополисахаридами, был осуществлен синтез наночастиц в присутствии олигосахаридов, в частности, на примере сахарозы. В качестве поставщика селена использовался диацетофенонилселенид при температуре 25°C под воздействием аммиака и было установлено, что образование наночастиц селена возможно. Во время синтеза не наблюдалось образование красного цвета, который мог бы свидетельствовать об образовании элементарного селена, а полнота прохождения реакции определялась методом ТСХ по исчезновению исходного соединения в растворе. На следующий день цвет меняется.

Полученные наночастицы в дальнейшем лиофильно высушивались, а размер определяли методом ДРС. Размер данных наночастиц составил от 37 нм до 220,2 нм, а средний размер 65,64.

Для создания стабильных наночастиц нами был использован в качестве стабилизирующего реагента TWEEN 80, данное поверхностно-активное вещество отличается гипоаллергенностью и применяется в фармацевтической практике в инъекционных формах как внутримышечного введения, так и внутривенного. Использование данного ПАВ может позволить повысить растворимость в воде других веществ при создании фармацевтических композиций с использованием наночастиц селена стабилизированных им.

На первом этапе нами рассматривался синтез наночастиц из диацетофенонилселенида под воздействием перекиси водорода, образующий селен со стабилизацией получаемых наночастиц TWEEN 80. Реакцию проводили при температуре 25°C, при наблюдении за синтезом на протяжении 60 суток не наблюдалось выпадения осадка. Размер ДРС от 37 нм до 220 нм, средний размер 69,72 нм. Аналогичная картина наблюдалась и при проведении синтеза при температуре 17°C.

В результате проведенной реакции нами был получен масляный раствор, содержащий наночастицы в TWEEN 80. В связи с тем, что при комнатной температуре данный ПАВ является жидкостью, то лиофилизация данного раствора невозможна, поэтому для дальнейшей стабилизации было проведено отделение от продукта воды и других сопутствующих компонентов при пониженном давлении и температуре. Полученные наночастицы были проанализированы методом ДРС при разбавлении водой и установлено, что размер их варьировался в интервале от 43 до 220,2 нм со средним размером 70,84 нм. При синтезе наночастиц со стабилизацией TWEEN 80 с аммиаком и при повышенной температуре (50°C) образовывался осадок и темный цвет, что свидетельствует об образовании микро и макрочастиц. Анализ ДРС показал размер от 91 нм до 955,4 нм, а средний размер составил 233,29 нм.

Образование наночастиц селена в присутствии TWEEN 80 из диацетофенонилселенида имеют некоторые недостатки, связанные с тем, что данное поверхностно-активное вещество находится в обычных условиях в жидкой форме, что приводит к тому, что лиофилизация полученных наночастиц невозможна, а нахождение в растворе приводит со временем к их агрегации. В связи с вышеперечисленным нами был осуществлен синтез наночастиц селена из

диацетофенонилселенида с Кремофором А-25, который в нормальных условиях представляет собой твердое вещество и как следствие позволит лиофилизировать получаемые наночастицы и хранить их в твердой форме. Для получения селена из диацетофенонилселенида на первом этапе был выбран 25% водный раствор аммиака, он в растворе приводит к разложению молекулы диацетофенонилселенида до селена других сопутствующих веществ. А образовавшийся селен, сталкиваясь с другими атомами селена образует наночастицы, которые стабилизируются за счет Кремофора А-25. Так как размер наночастиц селена находится в прямой зависимости от скорости разложения диацетофенонилселенида, скорости перемешивания и т.д., нами предполагалось образование под воздействием аммиака достаточно больших частиц, что и было подтверждено методом динамического рассеяния света и средний размер составил 177,5 нм, а интервал размера наночастиц находился в интервале от 91 нм до 531,2 нм.

Так как полученные результаты имели широкий интервал, а для исследования на биологическую активность необходимо использование одинаковых по размеру наночастиц, то было принято решение по замене аммиака на сульфат аммония, что в аналогичных условиях позволило получать наночастицы более однородного размера, доказательством чего послужили результаты ДРС, в которых размер наночастиц показывал интервал от 32 нм до 202,2 нм, со средним размером 58,83 нм.

Также в литературе отражено достаточно много методов синтеза наночастиц с использованием органических кислот при их воздействии на селенит натрия, поэтому нами было проведено исследование по возможности получения наночастиц селена в растворе с Кремофор А-25 под воздействием аскорбиновой кислоты. При анализе ДРС получены были результаты, которые показывают размер наночастиц в интервале от 43 до 615,1 нм. Средний размер 103,32 нм, однако визуальные характеристики показывали большую однородность наночастиц, поэтому нами были проведены исследования на электронном микроскопе и установлено, что размер наночастиц селена составляет в интервале от 50 нм до 150 нм, что достаточно достоверно коррелируется с данными ДРС, так как данный метод за счет возможности в отличии от электронной микроскопии способен фиксировать и органическую поверхность и включать ее в результаты анализа.

Также для создания более «мягких» условий образования селена из диацетофенонилселенида нами был использован метионин, при стабилизации наночастиц Кремофором А-25. В результате нами были получены стабильные растворы без осадка с средним размером частиц по ДРС 232,2 нм, а интервал составил от 164 до 295,3 нм. Что говорит о большей однородности полученных наночастиц относительно аскорбиновой кислоты и аммиака.

Исследование наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинипирролидоном на токсичность и местно-раздражающее действие

Прежде чем исследовать биологическую активность полученных наночастиц селена было необходимо определить LD₅₀, что в дальнейшем бы позволило бы оценить целесообразность их применения в повседневной практике. Испытание проводили на здоровых белых лабораторных мышах массой 19-21 г в соответствии с ГОСТ 32644-2014. Обработка полученных результатов показала, что пробит-

анализ - методом Прозоровского $LD_{50} = 103,74 \pm 5,86$ мг/кг, а по пробит-анализу - методом Финни $LD_{50} = 103,98 \pm 5,28$ мг/кг.

Для исследования гиперчувствительности замедленного типа применяли: метод максимального сенсибилизирующего воздействия (GPMТ) на примере кроликов породы Советская шиншилла. GPMТ - это тест *in vivo* для выявления веществ, вызывающих сенсибилизацию кожи человека (например, аллергенов). И метод закрытых накожных аппликаций (Buehler). Анализируя полученные результаты, была установлена умеренная эритема и припухлость, что свидетельствует о отсутствие местно-раздражающего действия наночастиц.

Онкопротективные свойства селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинилпирролидоном

Целью данного исследования явилось изучение онкопротекторных свойств наночастиц селена на модели глиобластомы мыши EPNT-5. Лечение онкологических заболеваний является одной из самых актуальных задач современной фармакопеи, что связано с растущим количеством случаев таких заболеваний, так и сложностью их лечения, в связи с необходимостью при каждом конкретном виде применять индивидуальную схему лечения, поэтому поиск новых действующих веществ, которые могут быть включены в общую терапию является актуальной задачей. Известно, что наночастицы обладают большими перспективами в данном направлении и могут быть в дальнейшем включены в состав комплексной терапии в различных условиях. Для предварительного определения возможности использования нами впервые синтезированных наночастиц, были проведены исследования на возможность уменьшения образования опухолей, вызванных клетками EPNT-5. Клеточная линия EPNT-5 была выбрана для исследования, поскольку она обладает определенными метаболическими и структурными характеристиками, близкими к таковым у GBM (Мультиформная глиобластома человека). Объектом исследования послужили лабораторные животные (мыши), которым были привиты раковые клетки (EPNT-5). Была проведена работа по формированию опытных и контрольной групп животных. На момент исследований животные были клинически здоровы. В рамках данного исследования нами было сформировано четыре опытные группы животных по 5 голов в каждой. Всем животным подкожно в область холки, вводили по 100 мкл раствора, содержащего $1 \cdot 10^6$ клеток/мл EPNT-5, а первой группе сразу же после введения клеток, внутривентриально, однократно вводили раствор наночастиц селена в дозе 3 мг/кг массы тела.

На 15 день исследования были обнаружены опухолевые образования у групп №1, №2 и №3. У группы №4 явные изменения не наблюдались.

У контрольной группы наблюдали наиболее выраженные образования. Размерность составляла от 4 до 16 мм в диаметре. Форма круглая, границы ровные и четкие. У группы №2 размер новообразований был достоверно меньше, в сравнении с образованиями контрольной группой. Новообразования круглой формы с оформленными краями. Их размерность варьировалась в пределах от 4 до 8 мм. У группы №3 и №4 процент образования был на уровень выше, чем у группы №2. Припухлости имели различную форму, в основном они имели размер в пределах 7- 10 мм. В особых случаях достигали до 2 см в диаметре. Но образования отчетливо выделялись на фоне остальных групп разнородной формой. На 17 день

исследования образования прогрессировали пропорционально, равномерно. Также у одной мыши из группы №4 появилось новообразование. К концу эксперимента необходимо было оценить изменения крови и внутренних органов животных. Кровь у мышей отбирали постмортально. Эвтаназию проводили с применением средств для наркоза. После вскрытия видимые опухоли просматривались только у группы №3 и №4. Кровь брали на общий и биохимический анализ. После вскрытия органы были взвешены, а также определен их процент от общей массы животных.

В результате данных исследований было установлено, что при применении наночастиц селена вероятность развития опухоли на примере EPNT-5 уменьшается на 80%.

Исследование влияния наночастиц селена на иммуногенную активность в антирабической вакцине

Исследование адьювантных свойств наночастиц, является на наш взгляд наиболее перспективным направлением, как со стороны возможных высоких характеристик, так и со стороны востребованности на рынке ветеринарных и фармацевтических препаратов.

Объектом исследования выступали наночастицы селена стабилизированные хитозаном и наночастицы селена стабилизированные поливинилпирролидоном. Изучение иммунобиологических свойств наночастиц селена проводили на лабораторных животных – белые нелинейные мыши. В ходе эксперимента оценивали адьювантные свойства наночастиц селена при вакцинации животных вакциной (Рабикан) «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51». Исследования проводили в четырех последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

В соответствии с целью исследования нами была предпринята попытка установления влияния наночастиц стабилизированных ПВП в антирабической вакцине. Для усиления иммунного ответа взято 10 мг/мл наночастиц стабилизированных ПВП, для одновременного введения с антирабической вакциной белым мышам. Для эксперимента были взяты белые мыши беспородные, не инбредные, в возрасте 2 месяцев, весом 10-15 г., клинически здоровые. Каждое разведение референс-вакцины, контрольной вакцины и испытуемой вакцины вводили по 0,5 см³ внутрибрюшинно 16 мышам двукратно с интервалом семь дней. Через 7 суток после второй вакцинации мышам вводили по 0,03 см³ интрацеребрально разрешающую дозу тест-штамма вируса CVS, содержащую по предварительному титрованию 5-50 LD₅₀/0,03 см³; срок наблюдения за инфицированными мышами составлял 14 суток. Учет проводился на 5 и на 14 сутки после контрольного заражения. Иммуногенную активность определяли объемным методом Национальных Институтов Здравоохранения США (НИН) на белых мышах. По этому методу сравнивают 50% конечное разведение (КР) испытуемой вакцины с 50% международного вакцинного стандарта или Национальной референс-вакциной, откалиброванной по международному стандарту.

Кр₅₀ референс-вакцины и Кр₅₀ испытуемой вакцины рассчитывают по следующей схеме, используя метод Рича и Менча и далее рассчитывали индекс иммуногенности.

Вместе с этим индекс иммуногенности у контрольной вакцины составил 1,75 МЕ/см³, у испытуемой вакцины с наночастицами селена в качестве адьюванта - 0,78 МЕ/см³.

Таким образом, можно констатировать, что наночастицы селена, стабилизированные поливинилпирролидоном, используемые совместно с иммунобиологическим препаратом (вакцина Рабикан) в концентрации 10 мг/мл по селену, подавляют иммунный ответ и снижают протективные свойства вакцины.

Для исключения иммуносупрессивных свойств веществ, стабилизирующих наночастицы селена, параллельно с экспериментом по изучению влияния наночастиц стабилизированных поливинилпирролидоном, был поставлен аналогичный эксперимент с наночастицами стабилизированными хитозаном в той же концентрации селена 10 мг/мл антирабической вакцины.

Индекс иммуногенности составляет у контрольной вакцины 1,75 МЕ/см³, у испытуемой вакцины стабилизированная наночастицами хитозана 0,60 МЕ/см³. Следовательно индекс иммуногенности у вакцины с наночастицами стабилизированными хитозаном в концентрации селена 10 мг/мл значительно ниже по сравнению как с самой вакциной Рабикан, так и с референс-вакциной.

Согласно полученным результатам, индекс иммуногенности в испытуемой вакцине с наночастицами стабилизированные поливинилпирролидоном и так же в вакцине наночастицы стабилизированные хитозаном уменьшился более чем на 50%, чем в контрольной вакцине. Таким образом наночастицы стабилизированные поливинилпирролидоном и наночастицы стабилизированные хитозаном сработали как вещество подавляющие иммунный ответ.

Данный факт может быть вызван завышенной концентрацией наночастиц селена, которые оказывают токсическое действие на весь организм животных, тем самым подавляя запуск каскада иммунологических реакций в ответ на введение патогена.

Поэтому на следующем этапе нашей работы было принято решение снизить дозу наночастиц селена вносимую в иммунобиологический препарат в 3 и 30 раз.

Учитывая тот факт, что стабилизирующие вещества такие как ПВП и хитозан не оказывают влияния на иммуногенные свойства вакцин. Нами было принято решение использовать только наночастицы стабилизированные ПВП.

Для этого нами было принято решение добавить в антирабическую вакцину наночастицы стабилизированные ПВП до концентрации 3 мг/мл и 0,3 мг/мл.

Установлено, что индекс иммуногенности составлял 1,05 МЕ/см³ – для контрольной вакцины, 1,1 МЕ/см³ - испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 3 мг/мл и 1,26 МЕ/см³ - испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 0,3 мг/мл.

Исходя из полученных данных можно заключить, внесение в вакцину Рабикан наночастиц селена стабилизированных ПВП, в концентрации 0,3 мг/мл способствует повышению ее иммуногенности.

Исходя из вышеизложенного можно сделать заключение, что внесение наночастиц селена стабилизированных ПВП в вакцину Рабикан способствует повышению иммуногенных свойств вакцины, а сами наночастицы можно рассматривать в качестве адьюванта. Применение вакцины Рабикан с

наночастицами селена стабилизированными ПВП в концентрации 0,3 мг/мл иммунобиологического препарата животным усиливает протективные свойства антигена на 18% относительно национальной референс-вакцины, откалиброванной по международному стандарту.

Наряду с вышеизложенным, нельзя не отметить, что в ходе выполнения экспериментов на белых нелинейных мышах по изучению влияния наночастиц селена на иммуногенную активность в антирабической вакцине во время и после введения изучаемых образцов вакцины в установленной дозе побочного действия, нежелательных реакций и серьезных нежелательных реакций со стороны животных выявлено не было.

Таким образом, доказано, что содержанием 0.3 мг/мл в антирабической вакцине с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном повысила эффективность вакцины, т.е. увеличены протективные свойства инактивированной антирабической вакцины из штамма «Щелково-51». Таким образом исследована и возможна к использованию безвредная, безопасная и высокоэффективная инактивированная антирабическая вакцина из штамма «Щелково-51», репродуцированного в перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13-13, и инактивированного β -пропиолактоном с добавлением 33,3% сахароза-пептон-желатинового стабилизатора с использованием как адьюванта наночастиц стабилизированными поливинилпирролидоном, для применения профилактической вакцинации собак и кошек.

Разработка мицеллярного раствора, обладающего гепатопротекторными свойствами на основе фосфотидилхолина, метионина, витамина Е и селена

В рамках данных исследований была проведена разработка мицеллярного раствора стабилизированного поверхностноактивным веществом TWEEN 80, содержащего в себе компоненты обладающими гепатопротекторными свойствами, так как для восстановления гепатобилиарной системы является наиболее эффективным комплексный подход позволяющий одновременно восстанавливать организм за счет использования различных компонентов, так фосфотидилхолин является эффективным гепатопротекторным действующим веществом входящим в состав «классических» препаратов, в частности «Эссенциале-форте», метионин является незаменимой аминокислотой и оказывает липотропное действие, витамин Е обладает гепатопротекторными свойствами и применяется в терапии животных и человека, а селен в синергизме с витамином Е усиливает его действие и так же является эффективным антиоксидантом.

Так как фосфотидилхолин и витамин Е не растворимы в воде, для создания стабильной водной формы одним из наиболее распространенных способов является использование коллоидных растворов, которые могут быть стабильны на протяжении длительного периода времени, а метионин и наночастицы селена или селенит натрия водорастворимы, что позволит вносить их в раствор без создания мицелл. Нами было разработано 28 рецептур, отличающихся концентрациями действующих веществ, в частности фосфотидилхолином, кроме этого, первые 14 рецептур имели в своем составе селенита натрия, а с 15 по 28 наночастицы селена. При определении стабильности полученных коллоидных растворов наблюдали на протяжении 6 месяцев из-за возможного выпадения осадка и было определено, что оптимальная рецептура это: № 7 и № 21 с составом фосфатидилхолин 0,24 г,

витамин Е 0,02 г, метионин 0,04 г, селенит натрия (наночастицы селена) 0,0011 г, бензиловый спирт 0,1 мл, 2-пирролидон 3,5 мл, ТВИН-80 0,8 мл, вода 5,3 мл. При анализе методом ДРС было установлено, что разброс размеров частиц лежит в интервале для образца №7 в двух интервалах от 11 до 18 нм и от 164 до 295 нм, и для №21 в трех интервалах 5,6-13,5, 24 –79 и 220-396 нм, а дзет-потенциал свидетельствующий о стабильности раствора в образце №7 с селенитом натрия составлял -12,5 мВ, а для образца № 21 с наночастицами селена составил -11,9 мВ.

Для определения гепатопротекторных свойств мицеллярного раствора при индуцированном тетрахлорметаном экспериментальном гепатите были сформированы 4 группы белых нелинейных мышей. Первой группе из 20 голов внутрибрюшинно вводился 50% раствор тетрахлорметана в оливковом масле в объеме 1,22 мл/кг живой массы. Лечение животных этой группы не проводили. Для подтверждения гепатотоксического действия тетрахлорметана проводили эвтаназию 10 голов через сутки после инъекции. 30 второй группе из 10 голов после введения тетрахлорметана проводилась терапия мицеллярным препаратом ежедневно со второго по шестой день. Третьей из 10 голов после введения тетрахлорметана проводилась терапия гепатита лекарственным препаратом сравнения «Эссенциале», ежедневно со второго по шестой день. Объем тетрахлорметана для провокации гепатита вводился в 50% летальной дозе. Четвертой группе (контрольной) - инъекции не проводились. Эвтаназию всех выживших животных осуществляли по достижении 50% гибели животных в первой опытной группе, методом транслокации шейных позвонков под газовым наркозом (изофлуран), с последующим взятием биологических материалов.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови животных на 6 сутки эксперимента показал, что активность индикаторных ферментов печени, аланиновой и аспарагиновой трансаминаз во второй и третьей опытной группах, находится достоверно выше значений контрольной группы животных. Однако активность данных ферментов значительно ниже, чем в группе мышей, которым вводили ксенобиотик тетрахлорметан без проведения терапевтических мероприятий. Данный факт указывает на восстановление структурно-функциональных свойств гепатоцитов, снижение воспалительно-деструктивных процессов в печени второй и третьей опытных групп мышей под действием гепатопротекторных препаратов. Во второй опытной группе животных, которым применяли с терапевтической целью мицеллярный препарат, отмечали достоверное повышение общего белка и его фракций, относительно животных третьей опытной группы, что может быть следствием синергизма метионина и селена, способствующих повышению компенсаторных факторов организма на действие ксенобиотика. Кроме того, метионин, входящий в состав препарата, способствует удалению из печени избытка жира, играет важную роль в синтезе адреналина, креатина, и ряда других биологически важных соединений, принимает участие в обмене содержащих серу аминокислот, реакциях дезаминирования, трансметилирования, декарбоксилирования; модулирует эффект витаминов (В9, В12, С) и гормонов, активизирует действие ферментов и белков. А также является мощным антиоксидантом, тем самым способствует обезвреживанию ксенобиотиков (в данном случае тетрахлорметана). Подавляет выделение гистамина, таким образом, способствует восстановлению ткани печени, путем

стимуляции рециркуляции глутатиона, регулирует азотистый баланс. Вместе с этим у животных опытной группы отмечаются достоверно более низкие показатели альбуминов, при завышенных концентрациях глобулиновых фракций белка относительно контрольных животных. Данные изменения указывают на снижение альбуминсинтезирующей функции печени в организме животных на фоне применения ксенобиотика, а повышение глобулиновых фракций является следствием выброса в кровь белков острой фазы воспаления, что и указывает на наличие воспалительно-деструктивных процессов в паренхиме печени.

Снижение общего белка и альбуминов отмечается и в третьей опытной группе мышей, которым с терапевтической целью назначали препарат сравнения. Это может быть следствием повышенных затрат энергии на восстановление функциональной активности гепатоцитов поврежденных действием ксенобиотика. При анализе динамики прироста массы тела животных установлено достоверное снижение среднесуточных привесов за 6 дней эксперимента у животных группы. В данной группе масса животных оставались на первоначальном уровне. Вместе с этим, у животных второй и третьей опытных групп прирост массы тела был достоверно выше, чем в группе, но значительно ниже, чем у контрольных животных. Данный факт указывает на негативное действие ксенобиотика, приводящее к нарушению обменных процессов в организме мышей. При анализе массы внутренних органов мышей достоверно установлено увеличение коэффициентов массы печени и почек в 1а и 1 группах животных относительно контрольных. Тогда как, во второй и третьей опытных группах мышей, которым после введения ксенобиотика тетрахлорметана вводили гепатопротекторные препараты, масса органов изменялась в рамках статистической погрешности, коэффициенты органов показывали аналогичный результат. Данные показатели находились в пределах физиологических значений для данного вида животных и не отличались от контрольной группы.

Вышеизложенное свидетельствует о том, что применение разработанного мицеллярного раствора животным с патологией гепатобилиарной системы, вызванной действием ксенобиотика (тетрахлорметан), способствует снижению воспалительной деструктивных процессов в печени и почках и, как следствие, восстановлению их функциональной активности.

Исследование ростстимулирующей активности наночастиц селена для семян яровой пшеницы и яровой ржи

В современном мире проводится интенсификация сельского хозяйства, а в связи с климатическими изменениями особую актуальность приобретают исследования, связанные с пред подготовкой семенного материала, что повышает урожайность и минимизирует риски. Использование наночастиц в качестве ростстимулирующих реагентов является одним из передовых направлений агротехнологий последнего десятилетия, это связано как с уникальными свойствами наночастиц, так иногда и с низкой себестоимостью их производства и возможностью легкого нанесения на целевой объект.

Посевные свойства семян – это совокупность физических свойств семян, определяющих степень их пригодности для посева. Среди них немаловажную значимость представляет чистота семенного материала, всхожесть, энергия

прорастания, влага и состояние здоровья (травмированность, незараженность болезнями и вредителями) и др.

Семена с высокими сортовыми и посевными свойствами позволяют повысить приrost урожая зерновых более чем в 30%. Однако далеко не все фермерские хозяйства сеют высококачественные семена. И причина тому, высокая цена. Цена семян зависит от новизны сорта и его качества. Но для того, чтобы раскрыть потенциал дорогостоящего сорта нужно применять специальные технологии, а большинство хозяйств выращивают пшеницу по упрощенной схеме. Высокие посевные качества яровой пшеницы – неотъемлемая часть технологии выращивания. В рамках повышения всхожести семян нами были проведены исследования по повышению всхожести с использованием наночастиц селена.

Для этого на семена были нанесены в сравнении с дистиллированной водой раствор наночастиц селена стабилизированные поливинилпирролидоном размером 2-4 нм в концентрации 0,25 мг/мл.

Эксперимент длился 10 дней и позволял получить следующие данные: длина ростков и корней, каждой семечки (в мм.), энергия прорастания семян – это количество проросших семян которые соответствуют стандарту, корешки, равные половине длины семени и более, а ростки равны длине семени и более, всхожесть – это количество вообще проросших семян деленое на общее количество семян и умноженное на 100%, дружность прорастания – это среднее число проросших семян за сутки, всхожесть деленая на число дней прорастания (в %).

Установлено, что наночастицы селена повышают энергию прорастания семян пшеницы яровой на 5-8 день на 6% относительно контроля, повышают дружность прорастания семян яровой пшеницы, обладая не высокой стоимостью и низкой токсичностью, применение наночастиц селена для повышения всхожести семян яровой пшеницы может быть целесообразно, применение наночастиц селена для увеличения всхожести семян позволит не только увеличить эффективность, но повысит содержание данного микроэлемента в широком спектре продуктов питания, что положительно скажется на здоровье.

Мы провели исследования возможности роста и физиологических изменений в ростовых процессах яровой ржи при использовании наночастиц селена стабилизированные поливинилпирролидоном размером 2-4 нм.

При анализе суточной динамики роста было установлено, что раствор с добавлением наноселена обладает наибольшей ростстимулирующей активностью.

Общая динамика роста также показывает, что селеносодержащие соединения оказывают благотворное влияние на рост и развитие семян яровой ржи. Динамика роста семян с использованием наночастиц селена показывает увеличение динамики роста семян на 91% по отношению к контролю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время уделяется большое значение синтезу и изучению свойств различных наноматериалов. Наночастицы имеют большое разнообразие положительных свойств, к ним можно присоединять диагностические и терапевтические вещества и таким образом легко осуществлять транзит микроэлементов, а также получать иммуноактивные биомолекулы. Эти поистине уникальные свойства наночастиц делают их интересными как для диагностики, так

и для терапевтического применения при лечении различных заболеваний. Наночастицы обладают пониженной токсичностью и малым временем для высвобождения лекарственного средства в системе кровообращения из-за их специфической характеристики. В животноводстве селен может повышать иммунитет и увеличивать эффективность животноводства при отсутствии негативных эффектов, нами было проведено экспериментальное внедрение наночастиц селена в хозяйстве Муммовское, которое показало возможность использования наночастиц селена для более эффективного выращивания крупного рогатого скота. Так же одно из наиболее перспективных направлений использования нанопрепаратов является растениеводство.

Применение нанотехнологий в сельскохозяйственном производстве может стать одним из способов решения проблемы продовольственной безопасности России. Повышение производительности сельскохозяйственного производства будет происходить за счет повышения ее продуктивности и качества растительного сырья, а не за счет расчистки и возделывания новых пахотных территорий. Еще один позитивный эффект в растениеводстве - сохранение стабильного объема урожая злаковых, зерновых и иных сельскохозяйственных культур в годы с неблагоприятными погодными условиями. Использование наноразмерных препаратов в сельскохозяйственном производстве высокоэффективно и не требует кардинальных изменений установившейся технологии производства.

Многофункциональные наноконпозиты, которые соединяют в себе терапевтические, диагностические и аналитические свойства в одной наноструктуре, представляют основу новой области нанобиотехнологии, названной тераностикой.

В рамках программы по развитию нанотехнологии в Российской Федерации, одним из направлений выделения бюджетных средств является создание перспективного противоопухолевого конъюгата для вакцин. Малоизученность наночастиц селена по сравнению с селеноорганическими соединениями представляет интерес, так как опубликованные труды показывают высокую эффективность наноразмерного селена в борьбе с раковыми образованиями и различными опухолями. Возможность проведения испытаний как на клетках *in vitro*, так и на животных позволяет проводить разнообразные опыты.

Исследование воздействия наночастиц на клетки Остеосаркомы человека MG-36 показали меньшую эффективность наночастиц селена по сравнению с золотом при равных концентрациях. Это связано с механизмом воздействия препаратов на клетки и хорошо показывает разницу между ними: золото наносит урон тканям или клеткам продуцируя свободные радикалы в то время, как селен превосходно показывает своё биологическое родство, стимулируя защитные механизмы. В связи с этим золото обладает токсичностью выше, чем селен. Это позволяет говорить о возможности применения последнего в больших концентрациях, без вреда для здоровья.

Выводы

1. Разработан новый метод синтеза наночастиц селена из диацетофенонилселнида и дихлордиацетофенонилселнида.
2. Определены размеры получаемых частиц методом электронной просвечивающей микроскопии и методом динамического рассеяния (ДРС) света,

установлено, что метод ДРС показывает большие размеры частиц чем микроскопия, что связано не с изменением размера частиц или неточностью оборудования, а определением размера наночастицы с оболочкой.

3. Установлено, что при применении наночастиц селена на 80% уменьшается вероятность развития опухолей, на примере белых беспородных мышей на клеточной линии. EPNT-5.

4. Изучена динамика формирования иммунитета у лабораторных животных, привитых антирабической вакциной с добавлением наночастиц стабилизированных поливинилпирролидоном. Получены результаты увеличения индекса иммуногенности на 19 %.

5. Установлено, что наночастицы селена снижают угнетение ростовых характеристик проростков по сравнению с контролем, а прирост биомассы корней, увеличивается на 15,4; при концентрации 10 мг/мл и 11,5 % при концентрации 50 мг/мл.

6. Разработана водорастворимая мицеллярная композиция на основе селена, фосфотидилхолина, метионина и витамина Е для восстановления гепатобилиарной системы организма.

7. Выявлены особенности роста и физиологических процессов у проростков яровой ржи на начальных этапах онтогенеза под влиянием регуляторов роста. Установлено, что ростовые процессы и развитие растений яровой ржи стимулируются добавлением в питательную среду наночастиц селена на 91% по отношению к воде. Увеличение динамики роста семян на ~25% было выявлено для диметилселенопирана, раствора изопропилового спирта в воде и диацетофенонилселенида.

Практические предложения

1. Использовать для синтеза наночастиц селена селеноорганические вещества, в частности, диацетофенонилселенид и дихлордиацетофенонилселенид.
2. Возможность использования наночастиц селена стабилизированных поливинилпирролидоном в качестве противоопухолевого препарата, адьюванта для вакцин и восполнения дефицита селена в организме млекопитающих.
3. При болезнях гепатобилиарной системы возможно использование композиции на основе селена, фосфотидилхолина, метионина и витамина Е для ее восстановления.
4. Использовать наночастицы селена как ростостимулирующее средство повышающих всхожесть семян.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Настоящее исследование по синтезу и исследованию биологической активности наночастиц селена стабилизированных различными ПАВ, могут быть использованы в качестве противоопухолевых препаратов, адьювантов для вакцин и восполнения дефицита селена в организме млекопитающих. Данные частицы могут применяться в качестве антимикробных препаратов и ростстимулирующих средств.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Патенты:

1. Патент 2760685 Российская Федерация. Композиция для инъекционного применения на основе фосфотидилхолина, метионина, витамина Е и селенита

натрия – «Гепарс», обладающая гепатопротекторными свойствами и способ ее получения / Я.Б. Древки, О.С. Ларионова, М.В. Осипова, **С.В. Горшунова**, Б.И. Древки, С.В. Козлов, С.В. Ларионов., заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». – № 2020143108; заявл. 25.12.2020; опублик. 29.11.2021, Бюл. № 34 – С. 46.

Публикации в изданиях, входящих в международные базы данных:

2. A new method for the selenium nanoparticles synthesis and study of their influence on the characteristics of physiological processes in spring rye seedlings at the initial stages of ontogenesis / **S. V. Gorshunova**, Ya B. Drevko, A.V. Bannikova, S.V. Larionov, B. I. Drevko // International scientific and practical conference "Ensuring sustainable development in the context of agriculture, green energy, ecology and earth science" – Saratov, 2021 – V. 723. – P. 022070. (Web of Science, Scopus).

3. Analysis of protein fractions of water-soluble peptides by dynamic light scattering / O.S. Larionova, Y.B. Drevko, V.A. Khanadeev, **S.V. Gorshunova**, E.S. Kozlov, S.V. Larionov // Izvestiya of Saratov University. Physics. – 2023. – V. 23(1). – P. 37-45. (Scopus).

Публикации в сборниках и материалах конференций:

4. **Горшунова, С.В.** Получение наночастиц селена как перспективного адьюванта для вакцин из дихлордиацетофенонилселенида / **С.В. Горшунова** // Современные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: сборник статей по итогам международной научно-практической конференции. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. – С. 249-251.

5. Определение диацетофенонилселенида в растворах с микроорганизмами методом вэжх с УФ-детектором / П.О. Полуэктов, Е.В. Тюрёва, **С.В. Горшунова**, Н.П. Трекина // Современные технологии: актуальные вопросы, достижения и инновации: сборник статей XXIX Международной научно-практической конференции. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. – С. 11-13.

6. Спектрофотометрический метод определения метилурацила / П.О. Полуэктов, А.Н. Исаков, Е.В. Тюрёва, **С.В. Горшунова**, Н.П. Трекина // Современные технологии: актуальные вопросы, достижения и инновации: сборник статей XXIX Международной научно-практической конференции. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. – С. 14-16.

7. Выделение антимикробных пептидов из личинок *Hermetia illucens* и перспектива их использования / К.Ю. Смирнова, Л.С. Крылова, Е.К. Ремизов, **С.В. Горшунова** // Международный вестник ветеринарии. – 2020. – № 2. – С. 58-62.

8. Ларионова, О.С. Синтез наночастиц селена и исследование особенности физиологических процессов в проростках огурца сорта родничок / О.С. Ларионова, Я.Б. Древки, **С.В. Горшунова** // Научная жизнь. – 2023. – Т.18, № 3 (129). – С. 375-382.

9. Спектрофотометрическое исследование дейодиддиацетофенонилселенида / Ю.А. Иванова, Я.Б. Древки, **С.В. Горшунова** // Зыкинские чтения: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2021. – С. 121-122.

10. Исследование ранозаживляющего действия препарата «Реагель» / О.С. Ларионова, Я.Б. Древки, С.В. **Горшунова**, К.Ю. Смирнова, И.М. Месянжина //

Зыкинские чтения: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2021. – С. 148-152.

11. **Горшунова, С.В.** Создание наночастиц селена для таргетной доставки пептидов в организм животных и человека / **С.В. Горшунова** // Материалы конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2020 год: сборник статей материалов конференции. Под общей редакцией Н.В. Неповинных, О.М. Поповой. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2021. – С. 62-65.

12. **Горшунова, С.В.** Синтез наночастиц селена размером 1-2 нм стабилизированных поливинилпирролидоном / **С.В. Горшунова** // Зыкинские чтения: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2021. – С. 66-68.

13. Использование 2,4,6-трифенил-4h-селенопирана в качестве средства для лечения и профилактики отравлений соединениями мышьяка / И.М. Месянжина, Б.И. Древко, Я.Б. Древко, **С.В. Горшунова** // Аграрные конференции. – 2021. – № 4 (28). – С. 34-39.

14. **Горшунова, С.В.** Исследование стабильности растворов наночастиц селена в оболочке поливинилпирролидона в различных растворителях / **Горшунова С.В.** // Зыкинские чтения: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2022. – С. 53-56.

15. Разработка матрицы для доставки в эпителий биологически активных компонентов / О.С. Ларионова, Я.Б. Древко, **С.В. Горшунова**, К.Ю. Смирнова, И.М. Месянжина // Зыкинские чтения: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2022. – С. 127-130.

16. **Горшунова, С.В.** Наночастицы селена как кормовая добавка для сельскохозяйственных животных / **С.В. Горшунова**, Я.Б. Древко // Зыкинские чтения: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина. – Саратов: Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, 2023. – С. 49-53.

17. Влияние разного уровня наночастиц селена и аспарагината кобальта в рационах телят на их рост, развитие и экономическую эффективность выращивания / И.И. Калюжный, С.О. Лощинин, С.П. Москаленко, С.В. Козлов, М.Ю. Кузнецов, **С.В. Горшунова**, А.Р. Грекалова, К.Ф. Кожевников // Зоотехния. – 2023. – № 11. – С. 14-17.