

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ГЕНЕТИКИ, BIOTEХНОЛОГИИ И
ИНЖЕНЕРИИ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА»

На правах рукописи

Горшунова Софья Владимировна

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

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Древяко Б.И.

Саратов – 2023

Оглавление

Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	13
1.1. Свойства селена как микроэлемента.....	13
1.1.1. Селен в иммунной системе.....	13
1.1.2. Селен и иммунная система.....	15
1.1.3. Функция селена и нейтрофилов.....	16
1.1.4. Селен как компонент селенопротеинов.....	18
1.1.5. Селен как токсичный элемент.....	21
1.2. Синтез наночастиц селена.....	35
1.2.1. Терапевтическое применение наночастиц селена.....	35
1.2.2. Происхождение и значение наночастиц селена.....	38
1.2.3. Наночастицы селена при лечении внутриклеточных микобактерий туберкулеза.....	41
1.2.4. Наночастицы селена для лечения инфекции <i>Toxoplasma</i> <i>gonii</i>	42
1.2.5. Проблемы использования наночастиц селена против бактериальных инфекций.....	43
2. Экспериментальная часть.....	46
2.1. Объекты и методы исследований.....	46
2.1.1. Синтез дихлордиацетофенонилселенида.....	46
2.1.2. Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселе- нида.....	46
2.1.3. Синтез диацетофенонилселенида.....	49
2.1.4. Синтез наночастиц из диацетофенонилселенида.....	49
2.1.5. Исследование острой токсичности наночастиц селена.....	55
2.1.6. Местнораздражающее действие наночастиц.....	55

2.1.7.	Методы исследования онкопротекторных свойств наночастиц селена размером 2-4 нм стабилизированных поливинилпирролидоном.....	58
2.1.8.	Разработка мицеллярного раствора, обладающая гепатопротекторными свойствами, на основе фосфотидилхолина, метионина, витамина Е и селена.....	60
2.1.9.	Исследование ростстимулирующей активности наночастиц селена для семян яровой пшеницы и яровой ржи.....	61
2.1.10.	Исследование влияния наночастиц в антирабической вакцине.....	63
2.1.11.	Определение полноты протекания реакции методом тонкослойной хроматографии.....	69
2.1.12.	Определение размера наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии.....	69
2.1.13.	Определение размера наночастиц при помощи метода динамического рассеяния света.....	71
2.1.14.	Статистическая обработка результатов исследований.....	73
2.2.	Результаты исследований и их обсуждение.....	74
2.2.1.	Синтез селеноорганических соединений.....	75
2.2.1.1.	Синтез дихлордиацетофенонилселенида.....	75
2.2.1.2.	Синтез диацетофенонилселенида.....	75
2.2.2.	Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида.....	75
2.2.3.	Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида.....	86
2.2.4.	Исследование острой токсичности наночастиц селена.....	109
2.2.5.	Местнораздражающее действие наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинилпирролидоном.....	111

2.2.6.	Онкопротективные свойства селена из дихлорди- ацетофенонилселенида стабилизированных поливинил- пирролидоном.....	113
2.2.7.	Исследование влияния наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливи- нилпирролидоном на иммуногенную активность в антирабической вакцине.....	130
2.2.8.	Разработка мицеллярного раствора, обладающая гепатопротекторными свойствами, на основе фосфоти- дилхолина, метионина, витамина Е и селена.....	145
2.2.9.	Исследование ростстимулирующей активности наночастиц селена для семян яровой пшеницы и яровой ржи.....	151
	Заключение.....	159
	Выводы.....	166
	Практические предложения.....	167
	Перспективы дальнейшей разработки темы.....	167
	Список литературы.....	168
	Приложения.....	192

Введение

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. Также 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 Е, 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 забеливаний 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, мРНК, 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, Parazyan, 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, ТВИН-80, поливинилпирролидона, а также хитозана и сахарозы.

Разработаны методы анализа наночастиц селена с использованием динамического рассеивания 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 адъюванта 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 рассеивания 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 адъюванта 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 гепатобиллиарной 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

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.

1. Обзор литературы

1.1. Свойства селена как микроэлемента

1.1.1. Селен в иммунной системе

Селен как важный компонент селеноцистеин содержащего белка участвует в большинстве аспектов биохимии и функции клеток. Таким образом, существует большой потенциал для селена, чтобы влиять на иммунную систему. Например, антиоксидант глутатионпероксидазы защищает нейтрофилы от радикалов, полученных из кислорода, которые вырабатываются для уничтожения поступивших чужеродных организмов. Когда функции всех селенопротеинов будут описаны, только тогда можно будет полностью понять их роль в поддержании оптимальной иммунной функции (Selenium and vitamins..., 2006).

Селен необходим для эффективной и действенной работы многих аспектов иммунной системы как у животных, так и у людей. Иммуитет и иммунная система представляют собой очень сложную совокупность процессов, которые действуют вместе, чтобы защитить организмы от атак патогенов и злокачественных новообразований. Многие иммунные функции включают воспалительные механизмы, которые при неконтролируемости могут быть вовлечены в патогенез таких состояний, как ишемическая болезнь сердца, рак и ревматоидный артрит. Клеточная биохимия селена также представляет собой сложную систему, которая включает в себя экспрессию широкого спектра селенсодержащих белков, многие из которых еще предстоит охарактеризовать (Kryukov, Gladyshev, 2002; Lescure, Gautheret, Krol, 2002). Селен содержится в различных количествах в горных породах и почвах разных регионов мира. В этих районах это отражается в различном количестве селена в кормовых культурах и рационах питания, а также наличие селена у животных и людей, которые потребляют продукты местного происхождения. Существует много споров о том, может ли модификация селенового статуса людей быть связана с измененной заболеваемостью и / или повышенной восприимчивостью ко многим заболеваниям. Однако нет никаких сомнений в том, что низкое потребление селена с пищей и последующий дефицит

сельскохозяйственных животных могут привести к широкому спектру заболеваний, которые часто связаны с одновременным дефицитом витамина Е (Turner, Finch, 1991). Были поставлены эксперименты на моделях сельскохозяйственных животных и грызунов. Такие эксперименты часто проводились, чтобы попытаться понять механизм, посредством которого недостаток селена был вовлечен в патогенез заболеваний. Таким образом, связь дефицита селена с дефицитом витамина Е привела к гипотезам, которые опирались на окислительные / антиоксидантные процессы (Antioxidant enzyme ..., 1993). Было высказано предположение, что антиоксидантные эффекты селена опосредованы через глутатионпероксидазы (GPx)⁴, которые удаляют потенциально вредные гидропероксиды липидов и перекись водорода. По крайней мере, пять из этих пероксидаз в настоящее время идентифицированы как действующие в различных клеточных и тканевых компартментах (Identification of..., 2001; Arthur, 2002). Таким образом, селен может действовать как антиоксидант во внеклеточном пространстве, клеточном цитозоле, в ассоциации с клеточными мембранами и, в частности, в желудочно-кишечном тракте, все с потенциалом влиять на иммунные процессы. Кроме того, тиоредоксинредуктазы, содержащие селен, могут также действовать как антиоксиданты (Selenite protects..., 2001).

Другие селенопротеины участвуют во многих других аспектах клеточного метаболизма, что увеличивает потенциал для распознавания побочных эффектов селена сверх тех, которые вызваны антиоксидантными системами. Более 20 селенопротеинов характеризуются очисткой, клонированием, рекомбинантной экспрессией и прогнозированием функции с использованием биоинформатических методов. Всего в геноме человека обнаружено 25 генов, кодируемых селенопротеинами. Таким образом, некоторые из > 30 белков, которые помечены ⁷⁵Se у животных и клеток должен быть обусловлен альтернативным спlicing (Hatfield, Gladyshev, 2002; Kryukov, Gladyshev, 2002; Lescure, Gautheret, Krol, 2002). Как и GPx, селеноферменты образуют семейства из трех тиоредоксинредуктаз и трех йодтиронин-дейодиназ. Они дают селену необходимые функции в окислительно-восстановительном контроле многих

метаболических функций в клетках (в частности, факторов транскрипции), а также в метаболизме гормонов щитовидной железы. Другими селенопротеинами, которые могут иметь антиоксидантные функции, являются селенопротеины Р и W. Что касается иммунной функции, существует также специфический селенопротеин 15 кДа, который был идентифицирован в Т-клетках, хотя его точная функция неизвестна. Другим селеносодержащим белком является селенофосфатсинтетаза, которая катализирует выработку селенофосфата. Этот селенофосфат является важным неорганическим предшественником для синтеза селеноцистеина из серина при синтезе селенопротеина. Семейства селенопротеинов, которые обсуждаются выше, являются кандидатами на вовлечение селена в иммунную систему. Подробности этих и других селенопротеинов обсуждаются в нескольких обзорах (Arthur, 2000; Hatfield, Gladyshev, 2002; Kryukov, Gladyshev, 2002; Lescure, Gautheret, Krol, 2002).

Таким образом, через селенопротеины селен может влиять на три широкие области функции клеток посредством антиоксидантной активности, метаболизма гормонов щитовидной железы и регуляции активности окислительно-восстановительных активных белков (Hatfield, Gladyshev, 2002). Все эти общие эффекты на обмен веществ могут быть связаны с более специфическими процессами, которые будут влиять на иммунную систему. Таким образом, очевидно, что влияние селена на иммунную систему является многофакторным, и конкретные обстоятельства определяют, какие системы затронуты (Effect of..., 2006).

1.1.2. Селен и иммунная система

Диетический селен необходим для оптимального иммунного ответа, хотя механизмы этого требования не всегда полностью поняты. Селен влияет как на врожденную, «неадаптивную», так и на приобретенную, «адаптивную» иммунную систему (Turner, Finch, 1991; Kiremidjian-Schumacher, Roy, 1998). Врожденная иммунная система включает барьеры для инфекции и неспецифические эффекторные клетки, такие как макрофаги. Как Т-, так и В-лимфоциты образуют

основные эффекторные клетки приобретенной системы, которые созревают с воздействием иммунных проблем. Селенодефициты с дефицитом менее способны размножаться в ответ на митоген, и в макрофагах синтез лейкотриена В₄, который необходим для хемотаксиса нейтрофилов, нарушается этим дефицитом. Эти процессы могут быть улучшены путем приема добавок селена. Гуморальная система также страдает от дефицита селена; например, титры IgM, IgG и IgA уменьшаются у крыс, а титры IgG и IgM уменьшаются у людей. В эндотелиальных клетках астматиков наблюдается выраженный дефицит селена, что приводит к увеличению экспрессии молекул адгезии, что вызывает большую адгезию нейтрофилов (лейкоцитов) (Turner, Finch, 1991; Kiremidjian-Schumacher, Roy, 1998).

1.1.3. Функция селена и нейтрофилов

Одной из наиболее широко исследованных связей между селеном и иммунной системой является влияние микроэлемента на функцию нейтрофилов. Нейтрофилы продуцируют радикалы, полученные из супероксида, чтобы принять участие в уничтожении микроорганизмов. Этот тип процесса представляет собой баланс между производством достаточного количества радикалов для уничтожения вторгшихся организмов и системами, которые защищают сами нейтрофилы от радикалов. Таким образом, хотя дефицит селена не влияет на количество нейтрофилов у ряда видов, некоторые аспекты их функции являются дефектными (Turner, Finch, 1991). Нейтрофилы мышей, крыс и крупного рогатого скота с дефицитом селена способны глотать патогены *in vitro*, но менее способны убивать их, чем нейтрофилы животных, с достаточным количеством селена (Boyne, Arthur, 1986). Эта дефектная функция была связана со снижением цитозольной активности GPx (GPx1) в нейтрофилах, что позволяет свободным радикалам, которые вырабатываются в дыхательном всплеске, убивать сами нейтрофилы. Изучение скорости выработки радикалов у стимулированных нейтрофилов у мышей подтверждает эту гипотезу. Начальная скорость снижения цитохрома с нейтрофилами, стимулируемыми форболмирилата ацетатом, была одинаковой у

мышей с дефицитом селена или мышей, изобилующих инъекцией IP с массой тела от 2,5 до 1000 $\mu\text{г}$ селена / кг. Однако только нейтрофилы животных, имеющие достаточное количество селена, смогли продолжать продуцировать радикалы в течение > 10 и ≤ 45 минут. Способность продолжать продуцировать радикалы зависит от повышенного статуса селена и активности GPx в нейтрофилах. Кандицидная активность нейтрофилов имела двухфазную картину. При очень низких дозах селена, назначаемых мышам с дефицитом, кандицидная активность увеличивалась с ~ 9 до 14%. Дополнительные добавки селена не увеличивали эту активность до тех пор, пока не были даны гораздо более высокие дозы, которые также коррелировали с изменениями активности GPx. Выводы из этих исследований заключаются в том, что существует более одной селен-зависимой функции или внутриклеточного компартмента, который регулирует способность иммунных клеток убивать поглощенные организмы. Отчасти это связано с активностью GPx1. Требуется дополнительная работа, чтобы определить, зависят ли первоначальные изменения в кандицидной активности от активности фосфолипида гидропероксида GPx и конкретного пула GPx1 или цитозольной или митохондриальной тиоредоксинредуктазы.

Исследования проводились на белых лабораторных мышах с дефицитом селена. Через пять дней после лечения нейтрофилы получали из брюшинной полости животных и инкубировали в сбалансированном солевом растворе и определяли их супероксиддисмутазу-чувствительную способность снижать цитохром c-550 нм в ответ на стимуляцию форбол мирилата ацетатом (1 мг формула мирилата ацетата/мл в 10 $\mu\text{л}$ ДМСО на 3-мл инкубации).

Активность цитозольной глутатионной пероксидазы (GPx1) и кандицидная активность у нейтрофилов мышей с дефицитом селена, получавших в течение 5 суток различными дозами селена. У белых лабораторных мышей вырабатывали дефицит селена с использованием протоколов и диеты, описанных ранее (Boyne, Arthur, 1986), и там, где это было указано, лечили селеном в виде селенита натрия в 0,9% NaCl путем внутрибрюшинной инъекции. Через пять суток после лечения нейтрофилы получали из брюшинной полости животных и

инкубировали в сбалансированном солевом растворе и определяли их антидицидную активность (Boyne, 1986). Увеличение активности в группах, получавших $> 10 \mu\text{г}$ селена/кг массы тела, было статистически значимым с $P < 0,05$ или выше (ANOVA и тест наименее значимой разницы).

1.1.4. Селен как компонент селенопротеинов

В настоящее время селен признан важным диетическим элементом для млекопитающих и для различных классов живых организмов, включая архей, водоросли, бактерии, а также для многих эукариот (Foster, Sumar, 1997). В действительности, у млекопитающих содержится около 25 селенопротеинов, и большее количество селенопротеинов содержится в организмах морской воды, таких как рыбы и водоросли (Lobanov, Hatfield, Gladyshev, 2009; In vitro..., 2010). Напротив, нет конкретных доказательств ключевой физиологической роли селена в высших растениях и грибах, что делает филогенез селенопротеинов сложным.

У млекопитающих и в различных классах организмов, перечисленных выше, селен ведет себя как своего рода «сульфур». Селенолат является более мягким и сильным нуклеофилом, чем его тиолатный аналог, который придает данной селенольной группе более сильную восстановительную способность, чем у аналоговой тиоловой группы (Nogueira, Rocha, 2010).

Тем не менее, роль, которую играет селен в разных классах прокариот и эукариот, нельзя рассматривать как простую замену аналога серы. В случае млекопитающих одним из наиболее важных мягких нуклеофилов, обнаруживаемых в клетках и во внеклеточных жидкостях, является сульфгидрильная группа, которую можно найти в низкомолекулярных соединениях (например, цистеине и глутатионе) или в белках с высокой молекулярной массой. Концентрация низкомолекулярных тиолов может достигать 5-10 ммоль/л в зависимости от рассматриваемой ткани (Cooper, Kristal, 1997; Dringen, 2000). Селенгидрильная группа является более мягким и мощным нуклеофильным центром, чем сульфгидрильная группа в живых клетках; однако селенольные группы гораздо менее распространены, чем тиолы, и они встречаются

только в небольшом количестве селенопротеинов (Evolutionary dynamics..., 2007; Araie, Shiraiwa, 2009). Эти соображения ясно указывают на важность селена в биологии и продемонстрировали, что даже молярное превышение сульфгидрильных/тиоло-вых/тиолатных групп над селенгидрильными/селенольными/селенолятными группами не может выполнить частично выясненную роль селена в физиологии клеток. По сути, эволюционное давление, которое привело к появлению селена в биологии, все еще не до конца понято, и, безусловно, селен выполняет важную химическую функцию, которую сера не может выполнять в биологической системе.

Важными вехами на пути выявления и селен-элемент с биологическими функциями были биохимического подтверждения, что млекопитающих глутатионпероксидазы является селенопротеин (Flohe, Gunzler, Schock, 1973; Selenium - biochemical ..., 1973) и демонстрация того, что этот элемент присутствует в селенопротеинах в виде селеноцистеин у прокариот (Chemical characterization..., 1976) и у эукариот (Forstrom, Zakowski, Tappel, 1978). В форме остатков селеноцистеинила селен содержится в различных селенопротеинах, где он ведет себя как более мягкий и мощный нуклеофил, чем его аналоги серы или кислорода (цистеин и серин) (Bock, Forchhammer, Heider, 1991; Burk, Hill 1993). После этого было определено, что большинство селенопротеинов содержат в своих структурах один остаток селеноцистеинила (Lu, Holmgren, 2009). Есть некоторые исключения, такие как селенопротеин Р рыб и млекопитающих, который содержит в своей функциональной структуре около десяти остатков селеноцистеинила (Evolutionary dynamics..., 2007).

Таким образом, физиологическая или естественная биологическая химия селена в прокариотических и эукариотических клетках опосредуется в основном его включением в селенопротеины. Включение атома селена в селенопротеины позвоночных является сложным и дорогостоящим и требует нескольких ферментативных стадий и уникальных макромолекулярных компонентов, включая участие специфической т-РНК, которая изначально заряжена серином (t-РНК[Ser]Sec), элемента последовательности вставки селеноцистеина (SECIS) и

белковых факторов (фактор удлинения EFSec и белок, связывающий белок SECISBP 2 (Bock, Forchhammer, Heider, 1991; Burk, Hill 1993; Allmang, Krol, 2006; Mouse models..., 2009).

Включение Se(IV) или Se(VI) в селеноцистеин требует NADPH-оксидазу и восстановленного глутатиона (GSH) в качестве восстановителей. После метаболизма Se(IV) или Se(VI) до Se(-II) включению селена в органическую часть серина способствует согласованное действие двух ферментов: во-первых, селенофосфатсинтаза катализирует введение фосфата в Se - (II) с образованием селенофосфата. Селенофосфат затем включается в специфическую заряженную серином t-РНК[Ser]Sec, превращая серин в селеноцистеин. Эта заряженная селеноцистеином t-РНК теперь может доставлять остаток селеноцистеила в селенопротеин. Включение селеноцистеина в кодон UGA требует помощи фактора удлинения (EFSec), последовательности вставки селеноцистеина (SECIS) и связывающего белка 2 SECIS (SBP2), эти элементы необходимы для перекодирования кодона прекращения UGA в кодон селеноцистеина UGA.

Действительно, чрезвычайно высокая химическая реакционная способность селеноцистеина в присутствии кислорода исключает его существование в качестве свободной аминокислоты в аэробной клеточной среде. Таким образом, чтобы обойти эту химическую проблему, механизм синтеза селенопротеинов эволюционировал до расширения существующего генетического кода, и кодон UGA, который обычно является кодом завершения для эукариотических и прокариотических белков, кодирует селеноцистеин, когда он присутствует в последовательностях РНК селенопротеинов. Фактически, включение селеноцистеина через встроенный UGA-кодон осуществляется путем перекодирования механизма, который направляет рибосомы не останавливаться на UGA-кодоне на мРНК селенопротеинов (Allmang, Wurth, Krol, 2009).

Селеноцистеин ферментативно синтезируется путем включения атома селена из селенофосфата вместо кислорода в О-фосфосерил-tРНК ([Ser]Sec), а затем получения селеноцистеил-tРНК ([Ser]Sec) (Allmang, Krol 2006; Allmang, Wurth, Krol, 2009; Mouse models..., 2009). Причина, по которой селеноцистеин “должен”

образовываться из гидроксильной группы серина, а не из тиола цистеина, является интригующим вопросом биохимии синтеза селенопротеина. Это может иметь как химические, так и биологические причины, то есть, возможно, “проще” ферментативно заменить атом кислорода атомом селена, чем заменить атом серы атомом селена. Биологически, возможно, механизму, используемому для синтеза селенопротеинов, потребовался серин, чтобы избежать неправильного включения цистеина вместо селеноцистеина, то есть весь механизм включения селеноцистеина в зарождающийся пептид селенопротеина может совершить больше ошибок при расшифровке между цистеином и селеноцистеином по сравнению с остатком серина (Bock, Forchhammer, Heider, 1991).

1.1.5. Селен как токсичный элемент

Селен был признан токсичным для домашнего скота и млекопитающих. Экспериментальная демонстрация того, что селен токсичен для позвоночных, создала сильный негативный взгляд на элемент, который был назван “селенофобией” (Frost, Olson, 1972). “Селенофобия” сохранялась даже после экспериментальной демонстрации питательной ценности селена у прокариот (Pinsent, 1954) и грызунов (Schwarz, Foltz, 1975). Идентификация его роли в антиоксидантных ферментах (Flohe, Gunzler, Schock, 1973; Selenium – biochemical, 1973; Arner, Holmgren, 2000; Chen, Berry, 2003) и его возможный защитный эффект против некоторых видов рака (The epidemiology..., 2000; Rayman, 2008; Risk of..., 2009; Selenium in..., 2009; Selenium: a double-edged..., 2010) остановили большую часть “селенофобии” в последние десятилетия. Фактически, внебиржевое потребление пищевых добавок с “антиоксидантом” селеном стимулировалось различными источниками, и использование пищевых добавок распространено во всем мире (Rayman, 2008; Safety of..., 2010), что имеет некоторые спорадические катастрофические последствия (Schuh, Jarpe, 2007). Однако в последнее время растет число эпидемиологических данных, указывающих на то, что хроническое пищевое или экологическое чрезмерное воздействие селена может увеличить риск некоторых видов рака, диабета II типа и бокового амиотрофического склероза (The

epidemiology..., 2000; Stranges..., 2010) убедительно указывает на то, что “селенофобия” не должна быть оставлена. Самое главное, что эти эпидемиологические данные четко указывают на то, что диетические уровни потребления селена и, главным образом, использование пищевых добавок с селеном должны тщательно контролироваться. Следовательно, длительный прием любого типа селеносодержащего препарата (неорганического или органического) для пищевых или терапевтических целей должен осуществляться под наблюдением врача. В противном случае риск увидеть селен в списке химических веществ, вызывающих тихие широкомасштабные пищевые пандемии.

Есть информация о биохимии взаимодействия селеноорганических соединений, особенно диселенидов с тиолами биологического значения. Молекулярный механизм (механизмы), участвующий в токсичности селена, четко не определен; однако взаимодействие неорганического и органического селена с тиолами, по-видимому, играет центральную роль в их молекулярной токсичности. По сути, Пейнтер (Painter, 1941) предположил, что токсичность селенита может быть связана с окислением эндогенных тиолов. Соответственно, селенит (Se(IV)) может каталитически окислять сульфгидрильные группы (Tsen, Tappel, 1958), образуя дисульфид и нестабильный посредник, содержащий –S–Se–S– связи (Ganther, 1968). Следовательно, с токсикологической точки зрения каталитическое окисление эндогенных низкомолекулярных и высокомолекулярных тиолов катионными или органическими формами селена может играть роль в долгосрочной токсичности, наблюдаемой у людей и животных, подвергающихся воздействию ежедневных доз селена, несколько превышающих те, которые считаются безопасными с точки зрения питания. Совсем недавно было высказано предположение, что селен-опосредованное окисление тиола может производить активные формы кислорода (АФК), которые могут опосредовать токсичность неорганических и органических форм селена (Kitahara, Seko, Imura, 1993; Spallholz, 1994; Davis, Spallholz, 1996; Selenium compounds..., 1998; Spallholz, Palace, Reid, 2004; Oxidation of..., 2007; Antioxidant-prooxidant..., 2010). Соответственно, исследования *in vitro* показали,

что окислительный стресс может быть фактором, участвующим в селен-индуцированной токсичности и апоптозе в различных типах клеток в культуре (Kitahara, Seko, Imura, 1993).

Однако экспериментальная демонстрация каталитического окисления тиолов на долгосрочную токсичность экологически или питательно значимых доз как неорганических, так и органических соединений селена может быть затруднена, поскольку окисление тиолов может быть ограничено временным взаимодействием соединений селена с несколькими высокомолекулярными мишенями, участвующими в регуляции клеточного метаболизма или клеточной сигнализации. По сути, селен может модифицировать активацию различных сигнальных путей после воздействия *in vivo* или *in vitro* как органических, так и неорганических форм селена (Ghose, Fleming, Harrison, 2001). Таким образом, систематическое изучение окисления сульфгидрильных групп метаболически важных тиосодержащих белков неорганическими и органическими соединениями селена будет способствовать идентификации потенциальных мишеней *in vivo*, которые вызывают токсичность селена. Поскольку молекулы, содержащие вицинальные тиолы, более эффективно окисляются формами селена, чем молекулы монотиола (Effect of..., 1998; Diphenyl diselenide..., 2000; Mechanisms of..., 2003), важно изучение взаимодействия неорганического и органического селена с белками, содержащими тиолы в непосредственной близости в их третичной структуре. Альтернативно, вычислительная идентификация метаболически значимых белков, содержащих вицинальные тиоловые группы, может указать, какие белки или метаболические пути с большей вероятностью являются мишенями неорганической и органической токсичности селена.

Токсичность органомоноселенидов может быть связана с их метаболической трансформацией в соответствующие селеноксиды (Chen, Ziegler, 1994; Selenoxidation by..., 2001; Oxidative metabolism of..., 2006). Селеноксид может реагировать с тиолами, регенерируя исходный моноселенид и дисульфиды. В соответствии с этим заметно, что метилфенилселенид и фенилселеноацетилен, которые не окисляют тиолы, могут окислять сульфгидрилсодержащий фермент

дельта-аминолевулиновую кислоту дегидратазу (δ -ALA-D) после его химической трансформации в соответствующие селеноксиды (Selenoxides inhibit..., 2001; Delta-Aminolevulinate..., 2002). Кроме того, введение метилфенилселенида грызунам вызывало ингибирование печеночного δ -ALA-D (Methyl phenyl..., 2004), который может быть следствием селенокисления метилфенилселенида через монооксигеназу (Chen, Ziegler, 1994; Selenoxidation by..., 2001; Oxidative metabolism of..., 2006). Таким образом, токсичность органомonosеленидов *in vivo* может быть результатом их селенокисления через монооксигеназы, которые будут образовывать селеноксиды, которые могут окислять клеточные молекулярные мишени, содержащие тиоловые группы. Таким образом, по крайней мере частично токсичность селенорганических соединений типа R-Se-R может быть опосредована взаимодействием их метаболически образованных селеноксидов с эндогенными тиолами.

Взаимодействие тиолов с диселенидными соединениями может быть легко продемонстрировано (Diphenyl diselenide..., 2000) и, безусловно, является важным фактором токсичности простого диарил-и диалкилдиселенида. Chaudière и др. (Chaudière, Courtin, Leclaire, 1992) продемонстрировали, что активность тиолоксидазы может помочь объяснить часть токсических эффектов диселенидов. Они изучили каталитический эффект нескольких диселенидов и эбселена в качестве окислителей низкомолекулярных тиолов (Chaudière, Courtin, Leclaire, 1992). Впоследствии продемонстрировали, что дифенилдиселенид и некоторые производные могут окислять дитиотрейтол (ДТТ, низкомолекулярный тиол) и фермент δ -ALA-D. Основываясь на этих результатах, было предположено, что токсичность дифенилдиселенида может быть связана с ингибированием δ -ALA-D, что может поставить под угрозу синтез гем-содержащих белков.

Токсический путь приводит к образованию потенциально токсичных промежуточных продуктов (супероксидный анион и перекись водорода). Терапевтический путь заключается в том, что приводит к образованию промежуточного селенола, который может, по аналогии с нативным ферментом GPx, разлагать пероксиды.

Было продемонстрировано, что воздействие дифенилдиселенида вызывает ингибирование δ -ALA-D, и это может привести к снижению гемоглобина крови (Diphenyl diselenide..., 2000; Diphenyl diselenide..., 2001).

В исследовании продемонстрировали, что ингибирующий эффект дифенилдиселенида может быть ослаблен удалением кислорода из среды (Effect of organic..., 1998). Также наблюдали, что растению δ -ALA-D не ингибировалось дифенилдиселенидом, что объяснялось отсутствием вицинальных тиолов в активном центре растительного фермента. Таким образом, ингибирование δ -ALA-D у млекопитающих дифенилдиселенидом было связано с присутствием вицинальных тиолов в активном центре фермента (Effect of organic..., 1998). Кроме того, ингибирование δ -ALA-D может увеличить концентрацию его субстрата, 5-аминолевулиновой кислоты, которая является молекулой прооксиданта (Penatti, Bechara, Demasi, 1996; Correlation between..., 1997). Следовательно, ингибирование δ -ALA-D может либо нарушить аэробный метаболизм, либо увеличить выработку окислительного стресса.

Учитывая тот факт, что дифенилдиселенид потенциально может взаимодействовать с любым тиолсодержащим белком, определили возможное ингибирование *in vitro* других тиолсодержащих ферментов дифенилдиселенидом. Было заметно, что дифенил диселенид является ингибитором эритроцитов и головного мозга Na^+ , K^+ -АТФазы (Borges, Rocha, Nogueira, 2005; Comparative studies..., 2008; Hemolytic and genotoxic..., 2009) и δ -АЛК-D. Кроме того, дифенилдиселенид также был ингибитором *in vitro* различных изоформ лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (Studies on..., 2009; Inhibitory effect..., 2011).

Особое токсикологическое значение эбселен и дифенилдиселенид могут индуцировать митохондриальную дисфункцию *in vitro* (Dual effect..., 2003; Mitochondrial dysfunction..., 2010). Наблюдалось, что эбселен и дифенилдиселенид индуцируют митохондриальную дисфункцию, которая была связана с окислением митохондриальной тиоловой группы. Неспособность циклоспорина А обратить вспять митохондриальные эффекты, индуцированные эбселеном и дифенилдиселенидом, позволила предположить, что редокс-регулируемая пара

перехода проницаемости митохондрий (mitochondrial permeability transition - MPT) механистически регулировалась способом, отличным от классической поры MPT (Mitochondrial dysfunction..., 2010). В отличие от результатов, Morin и др. (Dual effect..., 2003) показали, что митохондриальная дисфункция, индуцированная эбселеном, строго зависит от присутствия Ca^{2+} и независимо от окисления пиримидиновых нуклеотидов. Причины несоответствия на данный момент не ясны. Несмотря на это, дерегулирование функционирования митохондрий, по-видимому, связано с окислением тиоловых групп, расположенных во внутренней митохондриальной мембране, что усиливает роль окисления тиоловых групп как центрального молекулярного механизма, участвующего в токсичности селеноорганических соединений. Действительно, эбселен и дифенилдиселенид индуцировали образование агрегатов митохондриальных белков через межмолекулярную S-S- поперечную связь, которая была предотвращена дитиотрейтолом. Кроме того, селен-индуцированной митохондриальной дисфункции при посредничестве окисления тиола может помочь объяснить индукции апоптоза эбселен, дифенилдиселенид и другие органохалькогены (Yang, Shen, Ong, 2000; Antioxidant-prooxidant..., 2010), а противоопухолевая активность дифенилдиселенид у самок крыс, подвергшихся воздействию *N*-нитрозо-*N*-метилмочевины (Diphenyl diselenide..., 2008).

В подтверждение данных *in vitro* было показано, что воздействие высоких доз дифенилдиселенида *in vivo* вызывает истощение небелковых сульфгидрильных групп (NPSH) в различных тканях грызунов (Diphenyl diselenide..., 2000) и ингибирует печеночный и церебральный δ -ALA-D (Diphenyl diselenide..., 2000; Diphenyl diselenide..., 2001; Effect of..., 1998; Comparative studies..., 2008). Особое токсикологическое значение имеет ингибирование δ -ALA-D высокими дозами дифенилдиселенида, вызывающее снижение содержания гемоглобина в крови, что подтверждает раннее предположение о том, что синтез гемоконтанирующих белков может быть затруднен дифенилдиселенидом. Кроме того, дифенилдиселенид (в дозах, которые не ингибировали δ -ALA-D) может усиливать эффекты флуфеназина на печеночный δ -ALA-D мышей (Chronic treatment..., 2009).

Об острой и хронической токсичности селеноорганических соединений в литературе не сообщалось. Несмотря на это, есть обсуждение результатов, полученные с эбселеном и дифенилдиселенидом и некоторыми аналогами. Nozawa и др. изучили токсичность эбселена ($36,5$ и 365 $\mu\text{моль кг}^{-1}$) у мышей после внутрижелудочного введения и сообщили об отсутствии токсичности, когда масса тела и смерть использовались в качестве конечных точек токсичности (Susceptibility of..., 1996). Наблюдалось, что эбселен был более токсичен, чем дифенилдиселенид, после острого внутрибрюшинного введения крысам (Potential renal..., 2003).

Отличие от дифенилдиселенида, который был более токсичен для мышей, чем для крыс, эбселен показал аналогичную острую летальную активность у крыс и мышей при введении внутрибрюшинным путем (Potential renal..., 2003). Также наблюдали, что дифенилдиселенид не вызывал смертности после острого введения подкожным (Anti-inflammatory..., 2003; Potential renal..., 2003) или пероральным (Studies on..., 2009) путем. У мышей LD_{50} для дифенилдиселенида был выше 1 ммоль кг^{-1} после желудочного зонда (Antinociceptive properties..., 2007). Однако значительное снижение прироста массы тела наблюдалось после воздействия $0,025^{-1}$ ммоль кг^{-1} дифенилдиселенида по сравнению с контрольной группой. Таким образом, дифенилдиселенид был менее токсичен для мышей при пероральном или подкожном введении, чем при внутрибрюшинном.

После многократного подкожного введения крысам дифенилдиселенид не вызывал токсикологических эффектов, когда дозы были ниже 100 $\mu\text{моль/кг}^{-1}$ (Toxicological evaluation..., 2008). Однако в дозах, равных или превышающих эту, дифенилдиселенид вызывал потерю массы тела и биохимические изменения в печени, включая ингибирование δ -ALA-D (Toxicological evaluation..., 2008).

Введение эбселена кормящим крысам ($36,5$ $\mu\text{моль/кг}^{-1}$) в течение 21 дня увеличивало количество реактивных форм тиобарбитуровой кислоты в печени (TBARS) и снижало NPSH (небелковые тиоловые группы) (Additive pro-oxidative..., 2004). Следовательно, аналогично тому, что наблюдается с дифенилдиселенидом, токсичность эбселена может быть связана с эндогенным

истощением тиола и может быть связана с окислением тиолсодержащих ферментов.

Кроме того, высокая доза дифенилдиселенида в рационе питания в течение 8 месяцев не вызывала признаков гепатотоксичности или ренотоксичности у кроликов. Несмотря на относительное отсутствие грубой токсичности, были продемонстрированы некоторые биохимические изменения, связанные с прооксидантной активностью, такие как снижение уровня аскорбиновой кислоты (Changes in..., 2006). Напротив, недавно сообщалось, что острое внутрибрюшинное введение однократной низкой и умеренной дозы (5 и 50 мкмоль/кг⁻¹ соответственно) дифенилдиселенида было связано с печеночной токсичностью, тогда как однократная высокая доза 500 мкмоль/кг⁻¹ убивала 85% кроликов в течение 5 дней (Acute exposure..., 2010). Для изучения влияния химической структуры на токсичность диарилдиселенидов у мышей оценивали оральную острую токсичность дизамещенных диарилдиселенидов. LD₅₀ значений для дизамещенных диарилдиселенида были похожи на что нашли для дифенилдиселенид (LD₅₀ > 1 ммоль на кг⁻¹ к (*n*-ХЛ-с₆Н₄ГП)₂, *n*-(СН₃О-С₆Н₄ГП)₂ и (PhSe)₂ и >0.62 ммоль кг⁻¹ к (*m*-МВ₃-с₆Н₄ГП)₂). Поэтому введение функциональных групп в арильную группу диарилдиселенида не приводило к дополнительной токсичности (Savegnago, Jesse, Nogueira, 2009).

Метилселеноцистеин представляет собой монометилованную селеноаминовую кислоту, которую можно найти в растениях (Dumont, Vanhaecke, Cornelis, 2006), и он также рассматривается для фармакологических подходов. Чтобы охарактеризовать токсичность метилселеноцистеина, крысы ежедневно подвергались воздействию принудительного кормления в дозах 0,5–2,0 мг кг⁻¹ день⁻¹, а собаки–бигли получали ежедневные дозы 0,15–0,6 мг кг⁻¹ день⁻¹ в течение 28 дней. У крыс метилселеноцистеин индуцировал дозозависимую гепатомегалию, легкую анемию и тромбоцитопению. Также наблюдались гепатоцеллюлярная дегенерация, остановка сперматогенеза и атрофия желтых тел. Самки крыс были более чувствительны к токсичности метилселеноцистеина, чем самцы крыс. У собак метилселеноцистеин индуцировал легкую анемию. Хотя

у самок собак не наблюдалось изменений в морфологии печени, срединный печеночный некроз наблюдался у самцов собак, подвергшихся воздействию всех уровней дозы метилселеноцистеина (Johnson, Morrissey, Kapetanovic, 2008). В форме селенометионина селен функционирует как необходимый микроэлемент на уровнях 0,1–0,2 ppm (мг кг^{-1}) в рационе экспериментальных животных, но он становится токсичным при уровнях, превышающих 5 ppm (Jacobs, Frost, 1981). С растениями и, особенно, селен-накопление растений могут преобразовывать неорганические соединения селена, полученных из почвы в селенорганические соединения, в том числе метилселеноцистеин и селенометионин (Dumont, Vanhaecke, Cornelis, 2006; Selenium in..., 2009), самые первые сообщения о токсичности селена может быть связано с чрезмерным приемом этих двух селеноаминокислот (Franke, Painter, 1935). Дифенилдиселенид представляет собой соединение с относительно низкой токсичностью, но он может вызывать нейротоксические эффекты у грызунов в зависимости от дозы, носителя, пути введения и возраста животных. Соответственно, исследования, проведенные исследовательской группой, показали, что воздействие в течение 2 недель высоких доз ($250 \text{ мкмоль/кг}^{-1}$, подкожно) дифенилдиселенида увеличивало в 3 раза общее содержание селена в мозге мышей (Comparative deposition..., 2003). Кроме того, были накоплены убедительные доказательства того, что дифенилдиселенид проявляет судорожную активность. Фактически, внутрибрюшинное, но не подкожное или пероральное (Antinociceptive properties..., 2007) введение дифенилдиселенида вызывало судороги у мышей (Diphenyl diselenide..., 2006), предполагая, что нейротоксичность дифенилдиселенида зависит от пути введения и, возможно, зависит от его метаболизма до нейротоксичного промежуточного продукта, который может накапливаться до токсичных уровней только у мышей после внутрибрюшинного введения. В отличие от того, что наблюдалось после внутрибрюшинного введения дифенилдиселенида мышам, подкожная инъекция диселенида защищала мышей от судорожного и летального действия 4-аминопиридина (Diphenyl diselenide..., 2009). Следовательно, нейротоксический эффект органоселениума связан с видами и путем введения, поскольку введение

дифенилдиселенида внутривенно или подкожно (Anti-inflammatory..., 2003) не вызывало судорог у крыс. Точно так же кролики, подвергшиеся смертельным дозам дифенилдиселенида, не проявляли явных признаков нейротоксичности (Acute exposure..., 2010). Далее, в случае изменения химической структуры дифенилдиселенида, введение функциональных групп в арильную группу диарилдиселенида (*n*-метилдифенилдиселениды, *n*-хлордифенилдиселениды, *o*-аминодифенилдиселениды и *m*-трифторметилдифенилдиселениды) отменяли судорожный эффект у мышей. В случае алкилдиселенидов латентность начала судорог увеличивалась по мере увеличения алифатической цепи с 1 до 3 атомов углерода. Кроме того, дибутилдиселенид, дипентилдиселенид и дигексилдиселениды не вызывали судорог у мышей (Anti-inflammatory..., 2003). В дополнение к влиянию рассматриваемых видов нейротоксичность дифенилдиселенида также модифицируется возрастом крыс. Фактически, дифенилдиселенид, вводимый пероральным путем, который не вызывает признаков нейротоксичности у взрослых крыс, вызывал судороги у крысят (Involvement of..., 2007). В расширении этого исследования показано значительную отрицательную корреляцию между латентностью первого эпизода припадка и уровнями дифенилдиселенида в мозге крыс (Convulsant action..., 2010). Данные о токсикокинетике перорального введения дифенилдиселенида в дозе 500 мг кг⁻¹ взрослым крысам и мышам показали, что пиковые уровни дифенилдиселенида в плазме составляли 13,13 и 10,11 мкг мл⁻¹ (C_{max}) соответственно и происходили через 0,5 ч (T_{max}) после дозирования (Convulsant effect..., 2009). Исследование Шварца и Фольца в начале 1950-х годов обеспечило первоначальные наблюдения за тем, что селен, существенная часть экстракта почек, из которого был впервые идентифицирован селен, активный органический фактор 3, предотвращает некроз печени у крыс, получавших диету на основе дрожжей (*Cyberlindnera jadinii*) с дефицитом селена (Schwarz, Foltz, 1957). Связь между селеном и патологией печени быстро привела к признанию того, что селен является важным питательным микроэлементом, и картина истории селена начала меняться (Oldfield, 1987; Navarro-Alarcon, Cabrera-Vique, 2008), особенно

после демонстрации его молекулярной функции в клетках млекопитающих. Идентификация селеноцистеина в активном центре печеночной глутатионпероксидазы крысы вывела новый нуклеофил, то есть селенолат. Эта группа участвует в качестве мощного восстановителя в антиоксидантных ферментах, таких как глутатионпероксидаза и тиоредоксинредуктаза (Flohe, Gunzler, Schock, 1973; Selenium – biochemical..., 1973).

Поскольку глутатионпероксидаза катализирует восстановление широкого спектра гидропероксидов, но имеет некоторые недостатки, такие как нестабильность, низкая доступность и высокая молекулярная масса, которые ограничивают его терапевтическое применение, были предприняты значительные усилия по поиску селеноорганических соединений, способных имитировать ферментативные свойства глутатионпероксидазы и свободных от недостатков (Bhabak, Mugesh, 2010). Кроме того, полусинтетические ферменты, полученные с помощью ферментной инженерии, также были предложены в качестве каталитических молекул, подобных глутатионпероксидазе (Ren, Jemth, Boar, 2002; Towards more..., 2003).

Антиоксидантная активность

Окислительный стресс - это токсичное состояние, характеризующееся сдвигом в сторону прооксиданта в прооксидантном/антиоксидантном балансе в живых клетках. Несколько факторов, включая воздействие ксенобиотиков, радиацию, травму, инфекцию, загрязнение воздуха, избыточное потребление липидов и сахара, а также напряженную физическую активность, могут способствовать прооксидантному статусу клеток и, следовательно, могут способствовать развитию различных заболеваний. Фактически, окислительный стресс был вовлечен во многие заболевания, такие как Альцгеймер, Паркинсон, инфаркт миокарда, атеросклероз и диабет.

Селеноорганические соединения, способные распространять окислительно-восстановительный цикл селена, со свойством имитировать окислительно-восстановительную физиологическую химию селеноловых/селенолатных групп, могут дополнять естественную клеточную защиту от окислителей. Таким образом,

синтетические селеноорганические соединения могут представлять собой новую терапевтическую мишень для заболеваний, в которых играет роль окислительный стресс (Arteel, Sies, 2001). Таким образом, фармакологические исследования с селеноорганическими соединениями выявили проблемы во взаимосвязи доза–эффект из-за их контрастного поведения, зависящего от дозы (Nogueira, Rocha, 2010).

Глутатионпероксидазоподобная активность

Первым селеноорганическим соединением, о котором сообщалось в литературе как о молекуле, миметической глутатионпероксидазе, был эбселен. Эбселен в присутствии глутатиона катализирует восстановление широкого спектра гидропероксидов и может способствовать клеточной системе защиты от так называемого окислительного стресса (A novel..., 1984; A novel..., 1984). Механизм каталитического восстановления гидропероксидов эбселеном был предложен Майорино и его сотрудниками и оказался кинетически идентичным ферментативной реакции (Kinetic mechanism..., 1988). В отличие от реакции, катализируемой ферментом, который содержит места связывания придающие субстратную специфичность, эбселен и другие селеноорганические соединения могут использовать различные тиолы (A novel..., 1984; A novel..., 1984; Fischer, Dereu, 1987; Thiol peroxidase-activity..., 1992; Iwaoka, Tomoda, 1994; Glutathione peroxidase..., 2001). В дополнение к ГШ, в качестве субстрата (N-acetylcysteine..., 1987; Kinetic mechanism..., 1988; Mechanism of the..., 1990). С другой стороны, ряд доказательств указывает на то, что эбселен проявляет относительную каталитическую активность при восстановлении гидропероксидов арильными и бензильными тиолами (Bacq, Moussa, 2002). Bacq продемонстрировал, что алкилселенилсульфиды проходят путь дезактивации, который конкурирует с основным каталитическим циклом. Таким образом, эта цифра может помочь объяснить снижение каталитических свойств эбселена (Bacq, Moussa, 2003).

Тот факт, что глутатионпероксидазная миметическая активность эбселена зависит от восстановления селеновой кислоты до селенола тиолами, побудил Мугеша и его сотрудников изучить влияние природы тиолов на активность

пероксидазы эбселена. (Sarma, Mugesh, 2005). В продолжении этого исследования Бхабак и Мугеш далее показали, что природа пероксида мало влияет на каталитическую эффективность, в то время как природа тиолов оказывает значительное влияние на каталитическую активность эбселена и его аналогов (Bhabak, Mugesh, 2007). Также сообщалось о влиянии электронных и стерических эффектов на GPx-подобную активность эбселена (Pearson, Boyd, 2008).

Десятилетие 1990-х годов характеризовалось огромным развитием в области небольших синтетических селеноорганических соединений, имитирующих каталитическую активность глутатионпероксидазы, таких как бензоселеназины (Jacquemin, Christiaens, Renson, 1992), бензоселеназолины (Benzoselenazolinone derivatives..., 1994), камфоры, производных селеномида (Back, Dick, 1997), 2-фенилселенилнафтол (Synthesis..., 1995), 2-фенилселенилкетон (Evidence for..., 1994) и кислородсодержащие диселениды (Wirth, 1998).

Кроме того, был предпринят ряд попыток разработать и синтезировать связанные с эбселеном имитаторы GPx на основе эффектов заместителей или изостерических замен, большинство из которых имели ограниченный успех (Convenient synthesis..., 2004).

Были предприняты попытки улучшить растворимость в воде органохалькогенных соединений (o-Hydroxymethylphenylchalcogens..., 2005).

Кроме того, была исследована GPx-подобная активность третичных и вторичных амидзамещенных диарилдиселенидов. Таким образом, третичные амидзамещенные диселениды показали более высокую активность, чем соответствующие соединения на основе вторичных аминов (Bhabak, Mugesh, 2009). Авторы также показали, что различные каталитические механизмы могут объяснять более низкую GPx-миметическую активность соединений на основе вторичных аминов по сравнению с активностью трет-амидзамещенных диселенидов (Bhabak, Mugesh, 2008).

Сообщалось о серии *сек*-аминозамещенных диселенидов в качестве GPx-миметических соединений (Bhabak, Mugesh, 2009).

Предыдущее исследование, показало, что *p*-хлордифенилдиселенид, дифенилдиселенид и диэтилдиселенид обладают большей каталитической активностью, чем эбселен. Диселениды, *p*-аминодифенилдиселенид и дибутилдиселенид обладали плохой GPx-подобной активностью, в то время как *n*-метоксидифенилдиселенид и дипропилдиселенид не оказывали никакого эффекта (A development..., 1989). Кроме того, продемонстрировали, что дихолестероилдиселенид, который имеет громоздкую органическую часть, заметно снижает GPx-подобную активность по сравнению с дифенилдиселенидом (Comparative studies on..., 2008).

Дигидрохинолин, антиоксидант, используемый для защиты полиненасыщенных жирных кислот в рыбной муке и различных кормах для животных (De-Koning, 2002), был использован в качестве прототипа препарата для синтеза аналогов селенидов с перспективой получения GPx-миметических соединений. Аналог этилселена был более каталитическим, чем дифенилдиселенид, в то время как аналог фенилселена обладал пероксидазной активностью, аналогичной дифенилдиселениду, эталонному соединению в этом исследовании. Соответствующие аналоги теллура были наиболее эффективными катализаторами (Antioxidant profile..., 2007).

Сообщалось о GPx-подобной каталитической активности *транс*-3,4-дигидроксиселенолана, водорастворимого циклического селенида (A water-soluble..., 2010).

Селеноорганические соединения могут быть субстратами тиоредоксинредуктазы млекопитающих.

Млекопитающих селен-содержащий белок тиоредоксин редуктазы обладают широким спектром субстратной специфичности, сокращения не только в разных тиоредоксинах, а также натрия селенита (Kumar, Björnstedt, Holmgren, 1992), селенодиглутатиона (Björnstedt, Kumar, Holmgren, 1992), селеноцестеина (Selenium and the... 1997), селенил йодидов (Biomimetic studies..., 2002), эбселен (Lu, Holmgren, 2009), дифенилдиселенид, и некоторые аналоги (Reduction of..., 2010). Тиоредоксинредуктаза может восстанавливать селененилсульфидный комплекс

сывороточный альбумин–эбселен и высвободить свободный эбселен (Arteel, Briviba, Sies, 1999).

Убедительные доказательства группы Чжао указывают на то, что антиоксидантные и другие фармакологические свойства эбселена в значительной степени обусловлены его реакциями с системой тиоредоксина (Zhao, Holmgren, 2002). Система тиоредоксина состоит из НАДФН-оксидаз, тиоредоксина (Trx) и тиоредоксинредуктазы (TrxR). Тиоредоксинредуктаза представляет собой димерный FAD-содержащий фермент, который катализирует НАДФН-зависимое восстановление дисульфида активного центра в окисленном тиоредоксине с образованием дитиола в восстановленном тиоредоксине (Trx(SH₂)) (Tapiero, 2003).

Аналогичным образом сообщалось, что эбселен и диселенид эбселена способны перерабатывать аскорбиновую кислоту. Было обнаружено, что в присутствии эбселена TrxR и Trx млекопитающих быстро образуют селенол эбселена, который эффективно уменьшает дегидроаскорбиновую кислоту ввиду высокой нуклеофильности и оставляющего характера арилселенолатной части (Jung, Washburn, Wells, 2002). Эбселен в присутствии TrxR и Trx млекопитающих уменьшает дегидроаскорбиновую кислоту.

Миметическая активность токоферол-хинонредуктазы также приписывается эбселену (Vitamin E..., 2005).

1.2. Синтез наночастиц селена

1.2.1. Терапевтическое применение наночастиц селена

Наночастицы (НЧ) служат для снижения токсичности, повышения биоактивности, улучшения таргетинга и предоставляют универсальные средства для контроля профиля высвобождения инкапсулированной части. Среди различных наночастиц значительное место занимают неорганические наночастицы металлов, таких как Ag, Au, Ce, Fe, Se, Ti и Zn, благодаря их уникальной биоактивности в наноформах. Селен (Se) является важным микроэлементом. Он входит в состав селенопротеинов в виде селеноцистеина (Sec), представляющего наиболее важную часть активного центра их ферментативной

деятельности. Многие селенопротеины обладают активностью оксидоредуктазы и, таким образом, регулируют физиологический окислительно-восстановительный баланс. Селен имеет узкое терапевтическое окно, и границы токсичности очень тонкие, в то время как наночастицы селена (SeNPs) обладают значительно меньшей токсичностью. Наночастицы селена были исследованы при различных окислительных стрессах и воспалительных заболеваниях, опосредованных, таких как артрит, рак, диабет и нефропатия, с потенциальными терапевтическими преимуществами. Наночастицы селена представляют собой платформу для перевозки различных лекарств к месту действия. Здесь приводится значение наноразмерности для фармакологической активности селена. Представлена роль наночастиц селена в фармакологической защите от различных состояний, опосредованных воспалением и окислительным стрессом. Однако в значительной степени неизвестно, как наночастицы селена могут влиять на фармакокинетику и фармакодинамику селенопротеинов. Большинство доступных исследований были плохо разработаны без какого-либо сравнения с другими источниками селена. В будущем следует провести подробные исследования с включением соответствующего источника селена с акцентом на понимание роли селенопротеинов в наблюдаемой фармакологической активности (Nanocarriers for..., 2022).

Появление нанотехнологий за последние три десятилетия изменило восприятие открытия и разработки лекарств, открыв множество скрытых дверей в патофизиологии заболеваний и вариантах лечения (Nanocarriers as..., 2007).

Нанотехнология имеет дело с субмикроскопическими частицами, по крайней мере, с одним размером менее 100 нм. Разнообразные наноструктуры, включая полимеры, дендримеры, липосомы, металлические наночастицы, кремний и углерод, на основе наноматериалов используются в качестве успешных лечебных средств и лекарств носители (Brigger, Dubernet, Couvreur, 2002; Sun, Xia, 2002; Multifunctional inorganic..., 2008; Nanoceria ameliorates..., 2018). Уникальные особенности наночастиц (НЧ), такие как малый размер, высокая площадь поверхности, поверхностный заряд, химия поверхности, растворимость и

многофункциональность, делают их удивительно уникальными. Наночастицы очень убедительно доказали свою эффективность в качестве носителей лекарств благодаря огромным успехам в доставке терапевтических молекул. Наномедицина - это применение методов, основанных на нанотехнологиях, в медицинских исследованиях и клинической практике для лечения, диагностики, мониторинга и управления биологическими системами (Moghimi, Hunter, Murray, 2005). Наночастицы решают многие проблемы биофармацевтики и фармакокинетики (ПК), связанные со многими лекарственными средствами различных классов заболеваний. Наночастицы повышают терапевтическую эффективность ионизированных препаратов; улучшает проникновение водорастворимых соединений, белков, пептидов, вакцин, ДНК и другие биологические методы лечения. Модификация поверхности наночастиц целевыми лигандами делает систему доставки лекарственных средств очень универсальной и может избирательно доставлять их в целевое место (Sperling, Parak, 2010).

Наночастицы металлов Ag, Au, Ce, Fe, Se, Si, Ti и Zn занимают особое место в области нанотехнологий, поскольку они предоставляют уникальную возможность не только в качестве тераностических агентов, но и обладают огромным потенциалом в качестве носителей химиотерапевтических агентов, белков и т.д.

Несколько исследований продемонстрировали использование наночастиц селена в многочисленных биомедицинских практиках из-за биодоступности, низкой токсичности, антиоксидантных свойств и биосовместимости (Beyth..., 2015). Из-за их сниженной токсичности и способности постепенно высвобождать селен после приема внутрь наночастицы селена представляют собой то, что считается новым вариантом пищевых добавок (Effects of..., 2014). Кроме того, в нескольких исследованиях было доказано, что наночастицы селена обладают антимикробным действием против различных классов бактерий (Effects of..., 2014), поскольку они значительно подавляют развитие некоторых микробных патогенных штаммов, таких как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Leishmania* spp (Dupont, Christian, Hunter, 2014).

Более ранние исследования показали, что адаптируемые и внутренние иммунные реакции против паразитарных и микробных заболеваний зависят от селена для уничтожения этих микроорганизмов; следовательно, было продемонстрировано, что дефицит селена повреждает развитый и внутренний иммунитет и способствует уязвимости к широкому спектру бактериальных (инфекция *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*), паразитарных (инфекция *Heligmosomoides bakeri*, *Nippostrongylus brasiliensis* и *Trypanosoma cruzi*) и вирусных (ВИЧ-инфекция и вирус гепатита С) состояний (Antimycobacterial effect..., 2016; Prophylactic activity..., 2020). Основные антимикробные механистические пути этих наночастиц до сих пор не определены, несколько исследователей задокументировали мощное антимикробное воздействие, проявляемое некоторой формой селена в результате реакции с мембранными пероксидазами, а затем индуцирует образование свободных радикалов кислорода, состоящих из супероксидного аниона (Th1 immune..., 2015) Напротив, в некоторых исследованиях предпринимались попытки объяснить биогенный антимикробный механизм действия наночастиц селена путем запуска апоптоза у основных промастигот лейшмании и разнообразных эукариотических клеток (Efficacy of..., 2013).

1.2.2. Происхождение и значение наночастиц селена

Концепция наномедицины стала новой восходящей звездой в мире терапии в результате многочисленных преимуществ, которые предоставляет эта передовая платформа (*Ocimum sanctum*..., 2013; Borah, Yadav, 2015; Starch-templated..., 2018; Antimicrobial activit..., 2019; Facile biogenic..., 2020).

Многочисленные проблемы, которые могут возникнуть при использовании традиционных лекарственных форм, решаются с использованием стратегий, основанных на наномедицине (Dubey, 2004; Dubey, Jones, 2008; Selective targeting..., 2015; Engineered nanoparticles..., 2017; Vallet-Regí, González, Izquierdo-Barba, 2019).

Большинство людей согласны с тем, что одним из преимуществ наномедицины является большая безопасность, которую она обеспечивает. Проблемы токсичности селена были значительно уменьшены за счет использования селена в форме наночастиц, и самым большим препятствием для перевода селена является размер наночастиц, которые коррелируются с терапевтической эффективностью. Сообщалось о многочисленных методах, включая биологические и синтетические методы, для генерации наночастиц селена (Biogenic selenium..., 2021). Многие селеноферменты, включая глутатионпероксидазы (GPX), тиоредоксинредуктазы (TXNRD) и дейодиназы (DIO), необходимы для ряда биохимических процессов, включая встроенную систему антиоксидантной защиты организма (Selenoprotein gene..., 2016). Селен является ключевым компонентом многих из этих селеноферментов. Он обладает разнообразным антиоксидантным и прооксидантным действием в зависимости от дозировки, продолжительности и степени окисления (Fernandes, 2015). Использование наночастиц селена значительно снижает смертность, вызванную острой токсичностью селена проводимой на лабораторных животных - мышах, до четырех раз (Effects of..., 2021). Гепатотоксические показатели также демонстрируют, что наночастицы селена значительно снижают повреждение печени, вызванное высокими дозами селена (Wang, Zhang, Yu, 2007). Фундаментальный вопрос, хотя и удивительный, заключается в том, как наночастицы селена могут уменьшить токсикологические эффекты селена. Поскольку степень окисления селена вызывает наблюдаемые биологические эффекты и токсичность, которую она вызывает, понимание окислительно-восстановительного состояния селена имеет важное значение для ответа на этот вопрос (Wang, Zhang, Yu, 2007). Наиболее важными органическими формами селена являются селеноцистеин, селенометионин и метилселеноцистеин, тогда как наиболее важными неорганическими формами селена являются селенит и селенат (Effect of..., 2020). Степени окисления селена (Se) включают селенат, (SeO_4^{2-} , + 6), селенит (SeO_3^{2-} , + 4), селенид (Se^{2-} , + 2) и Se (Se^0) (Effect of..., 2020). Тщательно контролируемое взаимодействие нескольких степеней окисления селена,

возможно, способствовало снижению его токсичности после наноразмера (Zwolak, 2020). Биодоступность селена и растворимость в воде в различных степенях окисления определяют опасность реакции. Тем не менее, точная причина очевидной более низкой токсичности наночастиц селена пока неизвестна. Наночастицы селена обладают убедительной противоопухолевой активностью и меньшими проблемами, связанными с токсичностью, по сравнению с другими видами селена. Наночастицы селена использовались для лечения ряда заболеваний, включая рак, диабет, воспалительные заболевания, фиброз печени, лекарственную токсичность, *Mycobacterium TB* и *Toxoplasma gondii*, согласно Huang и др. (Free radical..., 2013) и Kumar и др. (Selenium nanoparticles..., 2014). Наночастицы селена удаляют свободные радикалы *in vitro* в зависимости от размера (5–200 нм). Согласно исследованиям Бо Хуанга и его коллег, небольшие (5-15 нм) наночастицы селена обладают более высокой способностью улавливать свободные радикалы и останавливать окисление ДНК. По сравнению со свободным Na_2SeO_3 , который показал $\text{IC}_{50} > 2,5$ мМ, наночастицы селена продемонстрировали более сильные эффекты при концентрациях до 0,5 мМ (Nano-selenium and..., 2018). Наночастицы селена обладают более высокой биодоступностью и биологической активностью по сравнению с неорганическими и органическими молекулами селена (Antimicrobial activity..., 2021). Однако у наночастиц селена есть основная проблема с недостаточным клеточным поглощением. Значительные усилия были предприняты для решения этой проблемы путем сопряжения специфических лигандов на внешней поверхности наночастиц. Это хорошее начало для лечения *Toxoplasma gondii* и *Mycobacterium TB*. Поверхностные укупорочные соединения могут увеличить размер, стабильность, селективность, токсичность, клеточное поглощение, биодоступность и биологическую активность наночастиц селена. Наночастицы селена могут быть использованы в качестве наноразмерных систем доставки лекарств, которые лечат заболевания (Antimicrobial activity..., 2021).

1.2.3. Наночастицы селена при лечении внутриклеточных микобактерий туберкулеза

Среди инфекционных инфекций туберкулез (ТБ), индуцируемый микобактериями туберкулеза (МТБ), был признан одним из ведущих убийц людей во всем мире. Изобретение новых заместительных методов лечения вне существующих стратегий антибиотиков для повышения эффективности лечения случаев туберкулеза стало необходимостью в связи с возникновением лекарственной устойчивости (Zwolak, 2020). Estevez и др. синтезировали стабилизированные хитозаном наночастицы селена и исследовали их влияние на *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium smegmatis* (Msm) (Antimycobacterial effect..., 2020). Изображения просвечивающей электронной микроскопии показали хорошо упорядоченные дисперсные наночастицы селена с хитозаном со сферическими частицами и равномерными диаметрами около 60–80 нм. Типичные стадии метаморфоза были ингибированы путем воздействия на бактерии наночастиц селена, нарушая целостность их клеточной оболочки. Эффективность наночастиц селена на микобактерицидах проводилась против двух типов вяло растущих микобактерий туберкулеза и быстрорастущих микобактерий туберкулеза с цифрами МПК 0,195 мкг/мл и 0,400 мкг/мл соответственно (Macrophage-targeted..., 2020). Помимо мгновенного истребления *Mycobacterium tuberculosis*, маннозилированные наночастицы селена также могут функционировать в качестве выдающегося носителя для точной доставки изониазида в макрофаги для повышенной внутриклеточной элиминации *Mycobacterium tuberculosis* (Chai, Zhang, Liu, 2018).

В частности, было показано, что наночастицы препятствуют выходу *Mycobacterium tuberculosis*-лизосомы и стимулируют интеграцию *Mycobacterium tuberculosis* в лизосомы, чтобы спровоцировать лизосомальный клиренс внутриклеточного *Mycobacterium tuberculosis*. Более того, активация нескольких антибактериальных иммунитетов клеток-хозяев против *Mycobacterium tuberculosis*, включающая апоптоз, аутофагию и антибактериальную поляризацию M1 для повышенной элиминации внутриклеточного *Mycobacterium tuberculosis*, была

эффективно достигнута Pi и др. (Macrophage-targeted..., 2020). Это исследование показывает возможность установления наночастиц селена для макрофагов, направленных на совместный бактерицидный подход с широким рядом присущих им иммунных целей и значительным снижением токсичности.

Основываясь на этом выводе, можно предположить, что наночастицы селена могут функционировать как более активное лекарство против туберкулеза и туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, чем некоторые терапевтические агенты, которые использовались в прошлом.

1.2.4. Наночастицы селена для лечения инфекции *Toxoplasma gondii*

Современные данные показали, что терапия наночастиц селена увеличивает клеточные иммуномодулирующие цитокины, такие как интерферон (IFN), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-2 (IL-2), туморнекротизирующий фактор (TNF) и некоторые медиаторы воспаления, включая оксид азота (NO). Иммунный ответ т-хелперных клеток (Th1), описанный генерацией IL-12 и IFN-, характерен для патогенов с несколькими внутриклеточными видами микробов, включая *T. gondii*, и мыши, у которых отсутствует IL-12 или IFN-, не могут регулировать инфекцию (Dupont, Christian, Hunter, 2012). На основании этой информации и обоснованы антимикробные и иммуномодулирующие свойства селена. Предположение о том, что наночастицы селена как мощный агент в борьбе с инфекциями *T. gondii*, приобрело большую актуальность. Например, Yazdi и др. исследовали терапевтическую эффективность наночастиц селена на мышинной модели против хронической *Toxoplasma gondii* (Th1 immune..., 2015). Заразили мышей штаммом *Toxoplasma gondii*. После этого инфицированным мышам вводили наночастицы селена в день в дозах 2,5, 5 и 10 мг кг⁻¹. Среднее количество кист мозговой ткани и уровни мРНК TNF-, IL-12, IL-10, ИФН и индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS) в каждой группе мышей измеряли на пятнадцатый день.

Аналогичное исследование, проведенное Keyhani и др., показало, что биогенные наночастицы селена (SeNP) обладают разнообразной терапевтической

активностью, включая антимикробные свойства против латентного токсоплазмоза (Prophylactic activity..., 2020). Исследование показало, что инъекция биогенных наночастиц селена в концентрациях 2,5–10 мг/кг в течение 2 недель способна предотвратить серьезные симптомы токсоплазмоза на мышинной модели. Этот результат продемонстрировал профилактические последствия наночастиц селена против врожденного токсоплазмоза без значительной токсичности. Однако, как и в исследовании Yazdi и др. (Th1 immune..., 2015) точные антитоксоплазменные механизмы наночастиц селена остаются неизвестными.

Эффективность биогенных наночастиц селена против острого токсоплазмоза у мышей также была определена Shakibaie и др. (Prophylactic activity..., 2020). Авторы изучили безопасность клеток *in vitro* и эффективность биологически активных наночастиц селена против тяжелого токсоплазмоза, индуцированного *Toxoplasma gondii* (Sarcocystidae) у мышей. Инфицированные мыши, получавшие наночастицы селена, имели значительно более низкое среднее количество тахизоитов, чем контрольные группы. Не было существенного различия ($P > 0,05$) в биохимических свойствах между клетками, которым вводили наночастицы селена, и в контрольной группе. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровни мРНК были значительно повышены у пораженных мышей, получавших наночастицы селена, в отличие от контрольной группы. Настоящее исследование согласуется с результатами Yazdi и др. (Th1 immune..., 2015) и Keyhani и др. (Prophylactic activity..., 2020), которые также установили, что наночастицы селена обладают значительной эффективностью в лечении острого токсоплазмоза у мышей без значительной токсичности.

1.2.5. Проблемы использования наночастиц селена против бактериальных инфекций

Как тип уникального наноструктурированного материала, наночастицы селена проявляют большой интерес к решению проблемы устойчивости к антибиотикам, демонстрируя многообещающие возможности для потенциальных терапевтических инфекционных методов лечения (Lee, Ko, Hsueh, 2019). Тем не

менее, существуют некоторые неизбежные барьеры, которые должны быть устранены, прежде чем их фармакологическая адаптация может начаться. Наиболее насущной проблемой является биосовместимость, то есть способность материала быть совместимым со здоровыми клетками. При введении в организм или жидкости организма подходящие биосовместимые наноматериалы не вызывают непредсказуемой цитотоксической активности или иммунологического ответа (Shiby, Reddy, Kumar, 2020). Токсичность избытка селена, с другой стороны, может приводить к негативным последствиям, которые могут быть вызваны введением наночастиц селена (Protective effect..., 2014). Несмотря на то, что токсическое действие наночастиц селена на противоопухолевую активность или противоионфекционные терапевтические вмешательства получило широкую огласку, токсическое действие наночастиц селена против стандартных клеточных компонентов еще предстоит исследовать (Gunti, Dass, Kalagatur, 2019). Таким образом, корреляция между наночастиц селена и селена чрезвычайно важна, особенно для молекулярных путей, которые в основном ответственны за различия в фармакотерапии и токсические воздействия, которые имеют решающее значение для их биосовместимости (Antibacterial activity..., 2021). Или же деградация наночастиц селена в организме неизвестна, что может привести к неизвестной токсичности после длительного введения (Antibacterial activity..., 2021). В результате следует уделять больше внимания деградации наночастиц селена после длительного приема, чтобы подтвердить безопасность наночастиц селена для клинического применения. В результате, разработка функциональных наночастиц селена с превосходными биосовместимыми и деградирующими свойствами будет наиболее важной задачей для проспективных биомедицинских исследований наночастиц селена против патогенов. Еще более важной проблемой для предстоящего исследования наночастиц селена будет изучение их антиионфекционных механизических путей, в частности, их воздействия и механизических путей на врожденный и адаптивный иммунитет (Macrophage-specific..., 2011). Решающее элиминационное воздействие наночастиц селена на патогенные штаммы является наиболее широко изученным аспектом их

перспективного использования против инфекции. Тем не менее, как хорошо известно, одной из наиболее серьезных проблем при инфекционных заболеваниях является реакция иммунных клеток на управление инфекцией. Предполагается, что активность селена, регулирующая иммунитет, тесно связана с селенопротеинами, которые играют важную роль как в метаболической активности, так и в иммунной функции. Тем не менее, еще предстоит выяснить, как селен из наночастиц напрямую влияет на иммунную функцию, контролируя действие селенопротеина. Кроме того, наночастицы селена, по нашему мнению, могут оказывать значительное влияние на активность фагоцитов, что будет в дальнейшем контролировать иммунную функцию. В результате крайне важно проанализировать влияние наночастиц селена на функции фагоцитов при использовании для лечения заразных патогенов, поскольку они также могут стимулировать иммунную систему организма против инфекции для профилактики инфекций и борьбы с ними.

2. Экспериментальная часть

2.1. Объекты и методы исследований

2.1.1. Синтез дихлордиацетофенонилселенида

Синтез осуществлялся в условиях кислотного катализа в присутствии этилового эфира уксусной кислоты в реакции ацетофенона с селенистой кислотой. Далее полученные кристаллы отфильтровывались и последовательно промывались водой, ацетоном и изопропанолом.

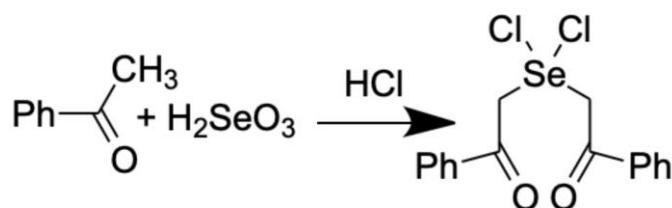


Рисунок 1 – Синтез дихлордиацетофенонилселенида

В плоскодонную колбу объемом 250 мл снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при постоянном перемешивании к 24 мл концентрированной соляной кислоты добавляли 4 мл воды, 5,4 г H_2SeO_3 после полного растворения понижали температуру до 7 °С. Далее к реакционной смеси добавляли 8,4 мл ацетофенона, 7,3 мл этилового эфира уксусной кислоты и перемешивали на протяжении 90 минут, затем добавляли 5 мл воды.

Полученные кристаллы отфильтровывали с использованием фильтра Шотта, промывали 50% раствором ацетона с водой в объеме 8 мл, далее раствором, содержащим 4 мл гексана, 1 мл этилового эфира уксусной кислоты и 0,5 мл изопропилового спирта, далее промывали полученные кристаллы после фильтрации раствором, содержащим 4 мл гексана и 0,5 мл изопропилового спирта.

2.1.2. Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида

Синтез наночастиц селена стабилизированных поливинилпирролидоном

В плоскодонную колбу объемом 1000 мл снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при постоянном перемешивании и температуре 50 °С к 500 мл изопропилового спирта добавляли 56,72 г поливинилпирролидона и далее 28,86 г

дихлордиацетофенонилселенида. Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее в раствор добавляли 500 мл воды и проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25 с аммиаком при повышенной температуре

В плоскодонную колбу объемом 100 мл снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при постоянном перемешивании и температуре 60 °С к водному раствору Кремофора А-25 смешивали с бензольным раствором дихлордиацетофенонилселенида. Далее по каплям добавляли водный раствор аммиака (Таблица 1). Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Таблица 1 – Количество веществ при синтезе наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25

Вода, гр	Дихлордиацетофенонилселенид	Кремофор А-25	Бензол	Аммиак	Сульфат аммония	Метионин	Аскорбиновая кислота	Перемешивание
100	0,01	0,5	5	5	-	-	-	30 мин
100	0,01	0,5	5	5	-	-	-	-
100	0,01	0,5	5	5	9,6	-	-	30 мин
100	0,01	0,5	5	5	9,6	-	-	-
100	0,01	0,5	5	5	-	2	-	30 мин
100	0,01	0,5	5	5	-	2	-	-

100	0,01	0,5	5	5	-	1	-	30 мин
100	0,01	0,5	5	5	-	1	-	-
100	0,01	0,5	5	5	-	-	10	30 мин
100	0,01	0,5	5	5	-	-	10	-

Синтез наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25 с сульфатом аммония

В плоскодонную колбу объемом 1000 мл снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при постоянном перемешивании и температуре 24 °С к водному раствору Кремофора А-25 смешивали с бензольным раствором дихлордиацетофенонилселенида. Далее добавляли сульфат аммония (Таблица 1). Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25 с метианином

В плоскодонную колбу объемом 1000 мл снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при постоянном перемешивании и температуре 24^{оС} к водному раствору Кремофора А-25 смешивали с бензольным раствором дихлордиацетофенонилселенида (Таблица 1). Далее добавляли метионин. Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25 с аскорбиновой кислотой

В плоскодонную колбу объемом 1000 мл снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при постоянном перемешивании и температуре 24 °С к водному

раствору 0,5 г Кремофора А-25 в 100 мл воды смешивали с раствором бензола 5 мл с 0,01 г дихлордиацетофенонилселенида. Далее добавляли 10 г аскорбиновой кислоты (Таблица 1). Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом динамического рассеивания света.

2.1.3. Синтез диацетофенонилселенида

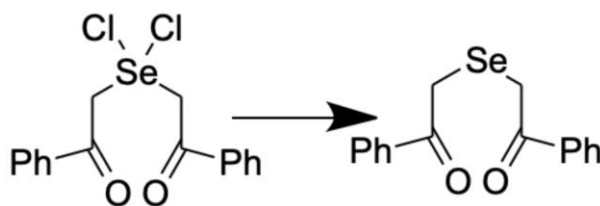


Рисунок 2 – Синтез диацетофенонилселенида

В стакан объемом 20 мл на водяной бане при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, к 9,6 мл воды добавляли 1 г дихлордиацетофенонилселенида и 1,4 г сульфита натрия. Перемешивали на протяжении 60 минут, далее в реакционную среду добавляли 2 мл воды перемешивали 10 минут и отфильтровывали. Полученный продукт помещали в стакан объемом 10 мл на водяной бане с магнитной мешалкой и добавляли 1,6 мл изопропилового спирта. Нагревали на водяной бане до 60 °С, до полного растворения. Отделяли органическую фракцию, охлаждали и фильтровали, полученные кристаллы промывали 2 мл изопропилового спирта. Выход 82%.

2.1.4. Синтез наночастиц из диацетофенонилселенида

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида стабилизированных ХИТОЗАНОМ

Хитозан для растворения смешивали с одномолярным раствором лимонной кислоты. Параллельно, производилось растворение навески диацетофенонилселенида в изопропанол. Далее оба раствора смешивали в плоскодонной конической колбе и активно перемешивали на магнитной мешалке до получения

гомогенного раствора. Далее в колбу добавляли раствор 0,1 н гидроксида натрия и при перемешивании на скорости 1500 об/мин нагревали содержимое до температуры 60°C. Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C стабилизированных ПВП под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при температуре 25 °С объемом 100 мл, помещали 10 мл изопропилового спирта и 0,2 г диацетофенонилселенида и перемешивали до полного растворения, далее при постоянном перемешивании и температуре 25 °С добавляли раствор 5 г поливинилпирролидона в 20 мл воды и далее по каплям добавляли 1 мл 25%-ого раствора аммиака в воде. Ход реакции отслеживался методом тонкослойной хроматографии по исчезновению в реакционной смеси исходного вещества. Далее добавляли 70 мл воды перемешивали 5 минут. Далее проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу объемом 250 мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и при температуре 25 °С вносили 100 мл воды и 5 г $C_{12}H_{22}O_{11}$ перемешивали до полного растворения, далее добавляли 0,02 г дииацетофенонилселенида и перемешивали 30 мин, далее при постоянном перемешивании добавляли по каплям 5 мл 25% аммиака и непрерывно перемешивали на протяжении 60 минут, далее остужали до -18 °С и лиофилизировали (Таблица 2). Полученные наночастицы анализируют методом ДРС и электронной микроскопии.

Таблица 2 – Данные для получения наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде C₁₂H₂₂O₁₁ под воздействием аммиака

№ синтеза	Дистиллированная вода, мл	диацетофенонилселенид, г	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , г	Аммиак, мл
1	100	0,02	5	10
2	100	0,05	5	5
3	100	0,02	1	5

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°С в среде TWEEN 80 под воздействием перекиси водорода

При постоянном перемешивании на магнитной мешалке при температуре 25°С в плоскодонную колбу объемом 50 мл отмерили дозатором 15 мл TWEEN 80, после добавили 0,2 г диацетофенонилселенида. После полного растворения при постоянном перемешивании постепенно добавили 1 мл водорода пероксид и перемешали на протяжении 30 минут. Далее, колбу поместили в темное место при температуре +25°С на протяжении недели.

После проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и методом динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 50°С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу объемом 50 мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и водяной бане при температуре 50°С поместили 15 мл TWEEN 80 и 0,2 г диацетофенонилселенида. После полного растворения диацетофенонилселенида, добавили по каплям 1 мл 25%-й раствор аммиака в воде и перемешали на протяжении 30 минут. Далее, колбу поместили в темное место при температуре +25°С на протяжении недели. После проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при температуре 25°C объемом 100 мл, помещали 15 мл TWEEN 80, 0,2 г диацетофенонилселенида и перемешивали до полного растворения, далее при постоянном перемешивании и температуре 25°C по каплям добавляли 1 мл 25% раствора аммиака в воде и перемешивали на протяжении 30 минут. Далее добавляли 30 мл воды и перемешивали 5 минут и остужали до -18°C и лиофилизовали. Полученные наночастицы анализировали методом ДРС и электронной микроскопии.

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 17°C в среде TWEEN 80 под воздействием перекиси водорода

В плоскодонную колбу объемом 50 мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке и водяной бане при температуре 17°C в 15 мл TWEEN 80 добавили 0,4 г диацетофенонилселенида. После полного растворения при постоянном перемешивании добавили 1 мл перекиси водорода (50%) и перемешали на протяжении 30 минут. Далее, колбу помещали в темное место при температуре +3°C на протяжении недели. Далее охлаждали и проводили лиофилизацию, полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена при повышенной концентрации диацетофенонилселенида при температуре 50°C в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу объемом 50 мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при температуре 50°C в 15 мл TWEEN 80 добавили 0,4 г диацетофенонилселенида. После полного растворения при постоянном перемешивании по каплям добавили 2 мл 25%-й раствор аммиака в воде и перемешали на протяжении 30 минут. Далее, колбу поместили в темное место при температуре +25°C на протяжении недели. После проводили лиофилизацию,

полученные наночастицы анализировались методом электронной просвечивающей микроскопии и метода динамического рассеивания света (ДРС).

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде Кремофора А-25 под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при температуре 25 °С объемом 250 мл, помещали 100 мл воды и 0,5 г Кремофор А-25 и перемешивали до полного растворения, далее при постоянном перемешивании вносили 5 мл 25% раствора аммиака и далее вносили 0,01 г диацетофенонилселенида растворенного в 5 мл бензола и перемешивали при заданной температуре 25 °С на протяжении 30 минут и далее остужали до -18 °С и лиофилизуют. Полученные наночастицы анализировали методом ДРС и электронной микроскопии.

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде Кремофора А-25 под воздействием сульфата аммония

В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при температуре 25 °С объемом 250 мл, помещали 100 мл воды и 0,5 г Кремофор А-25, 9,6 г сульфата аммония и перемешивали до полного растворения и далее вносят 0,01 г диацетофенонилселенида растворенного в 5 мл бензола и перемешивали при заданной температуре 25 °С на протяжении 30 минут и далее остужали до -18 °С и лиофилизовали. Полученные наночастицы анализировали методом ДРС и электронной микроскопии.

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде Кремофора А-25 под воздействием аскорбиновой кислоты

В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при температуре 25 °С объемом 250 мл, помещали 100 мл воды и 0,5 г Кремофор А-25, 10 г аскорбиновой кислоты и перемешивали до полного растворения и далее вносили 0,01 г диацетофенонилселенида растворенного в 5 мл бензола и перемешивали при заданной температуре 25 °С на протяжении 30 минут и далее

остужали до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофилизуют. Полученные наночастицы анализируют методом ДРС и электронной микроскопии.

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в среде Кремофора А-25 под воздействием метионина

В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и водяной баней при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ объемом 250 мл, помещали 100 мл воды и 0,5 г Кремофор А-25, 2 г метионина и перемешивали до полного растворения и далее вносят 0,01 г диацетофенонилселенида растворенного в 5 мл бензола и перемешивали при заданной температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ на протяжении 30 минут и далее остужают до $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофилизовали. Полученные наночастицы анализировали методом ДРС и электронной микроскопии.

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в среде TWEEN 80 под воздействием высокой концентрации аммиака

В плоскодонную колбу объемом 50 мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 15 мл TWEEN 80 добавили 0,2 г диацетофенонилселенида. После полного растворения при постоянном перемешивании добавили 2 мл 25%-й раствор аммиака в воде и перемешали на протяжении 30 минут. Далее, колбу поместили в холодильник при температуре $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$ на протяжении недели. Полученные наночастицы анализировали методом ДРС и электронной микроскопии.

Синтез наночастиц селена при повышенной концентрации диацетофенонилселенида при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака

В плоскодонную колбу объемом 50 мл при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 15 мл TWEEN 80 добавили 0,4 г диацетофенонилселенида. После полного растворения при постоянном перемешивании добавили 1 мл 25%-й раствор аммиака в воде и перемешали на протяжении 30 минут. Далее, колбу поместили в темное место при температуре

+25°C на протяжении недели. Полученные наночастицы анализировали методом ДРС и электронной микроскопии.

2.1.5. Исследование острой токсичности наночастиц селена

Исследования проводились на белых лабораторных мышах массой 19-21 г, которые случайным образом были отобраны в группы и находились на карантине на протяжении 5 суток. Каждому животному вводили вещество, растворенное в воде в объеме 100 мкл, при этом дозировка подбиралась исходя из концентрации, не меняя общий вводимый объем. В каждой группе было по три животных, которые в течении суток перед дозированием находились в изолированных клетках в помещении с постоянной температурой для того, чтобы у мышей была возможность адаптирования перед началом испытания. Каждую серию наночастиц селена испытывают на 3 мышах. Кормление животных осуществляли через 1-2 часа после введения препарата, вода была в постоянном доступе. Индивидуальное наблюдение за животными осуществляли через 30 мин, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов и 24 часа после введения, далее наблюдение проводили на протяжении 13 суток ежедневно. Все животные были подвергнуты аутопсии, а все изменения по животным фиксировались в индивидуальном бланке, созданном для каждого испытуемого.

2.1.6. Местнораздражающее действие наночастиц

Для исследования гиперчувствительности замедленного типа применяли: метод максимального сенсibiliзирующего воздействия (GPMТ). GPMТ - это тест *in vivo* для выявления веществ, вызывающих сенсibiliзацию кожи человека (например, аллергенов). И метод закрытых накожных аппликаций (Buehler). Buehler - это тест *in vivo* для выявления веществ, вызывающих сенсibiliзацию кожи человека (т.е. аллергенов).

Для этого шерсть кролика на подопытных участках кожи тщательно выстригали до начала исследования.

Приготовлены были следующие растворы для исследований:

- 1) №1 - Адьювант Фрейнда + физраствор 50/50

2) №2 - Исследуемый образец наночастиц селена

3) № 3 - Исследуемый образец + Адьювант Фрейнда 50/50

Доза, вводимая внутрикожно в каждой исследуемый участок, составляла 0,1 мл.

Для аппликаций пропитывали исследуемой пробой фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку, которые прикладывают на выстриженные участки кожи и фиксируют окклюзионной повязкой вокруг тела животного.

Для достоверности исследований должно было рассмотрено возможное влияние введения полного адьюванта Фрейнда (FCA) в сочетании с испытуемым материалом во время основного теста и, таким образом, возможное искажение результатов.

Через 24 ч снимали повязку с образцами и оценивали состояние опытных участков на наличие эритемы и отека.

Каждому животному в выстриженные участки кожи (А, В и С) проводили парные внутрикожные инъекции в объеме 0,1 мл.

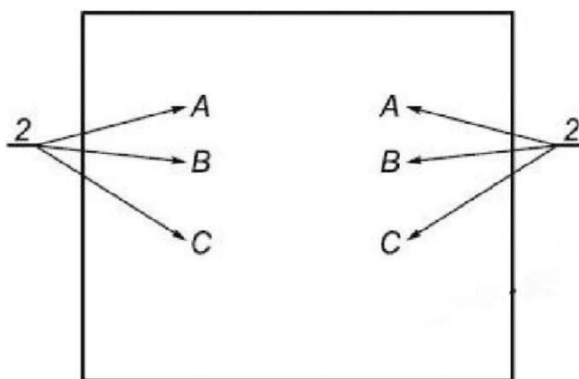


Рисунок 3 – Расположение участков внутрикожной инъекции

А: Смесь полного адьюванта Фрейнда с выбранным растворителем в соотношении = 50/50. Необходимо использовать физиологический солевой раствор (в соответствии с Британской Фармакопеей, Фармакопеей США или эквивалентный) для водорастворимых материалов.

В: Испытуемый образец наноселена (неразведенный экстракт); контрольным животным вводили только растворитель.

С: Испытуемый образец наноселена в концентрации, выбранной для участка В, эмульгированный с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 50/50 и растворителем (50%); контрольным животным вводили только эмульсию контрольного раствора с адьювантом (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Внутрикожные инъекции в объеме 0,1 мл на выстриженном участке кожи кролика породы Советская шиншилла

Далее наблюдали местную индукционную фазу. Через семь дней (± 1 день) после внутрикожной индукционной фазы начинали накожные аппликации исследуемого материала на участки инъекций, на внутритропаточную область каждого животного, используя для этого пропитанные кусочки фильтровальной бумаги или марли площадью 8 см. При этом используют концентрацию наноселена согласно для участка В. Если максимальная концентрация не вызывала раздражения, предварительно обрабатывают область аппликации 10%-ным раствором натрия додецил сульфата, вмассировав в кожу за (24 ± 2) ч до аппликации. Накладывали окклюзионную повязку. Удаляли повязку через (48 ± 2) ч.

Растворы всегда приготавливались перед применением, так как, приготовлены ранее чем за 24 ч растворы, могут быть недостаточно стабильны, а исследований по стабильности на данном этапе не проводилось. Процедуру с контрольными животными повторяли в том же режиме, используя только контрольный раствор.

Через 14 дней (± 1 день) после завершения местной индукционной фазы провоцировали всех опытных и контрольных животных испытываемым материалом. Для этого проводили аппликации исследуемого материала в концентрации согласно для участка С на интактные участки кожи бока каждого животного, используя фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку. Разбавления этой концентрации могли также быть наложены к другим интактным участкам подобным образом. Накладывали фиксирующую окклюзионную повязку. Удаляли повязку и аппликации через (24 ± 2) ч.

2.1.7. Методы исследования онкопротекторных свойств наночастиц селенаразмером 1-2 нм стабилизированных поливинилпирролидоном

Исследование проводилось на белых мышах линии balb/c нами было сформировано четыре опытные группы животных по 5 голов в каждой (Рисунок 5) из которых вводили по 100 мкл раствора, содержащего $1 \cdot 10^6$ клеток/мл EPNT-5.



Рисунок 5 – Группы животных, задействованные в исследованиях на противоопухолевую активность

Для введения клеток EPNT-5 соблюдали технику безопасности, для этого пробирку с клеточной линией центрифугировали 5 минут при 2500 об/мин, далее, соблюдая стерильность, удаляли надосадов до 2 мл, осадок ресуспендировали без пузырей. Далее подсчитывали количество клеток в полученной взвеси в камере Горяева с использованием микроскопа «Микромед И ЛЮМ» в среде RPMI-1640. Затем средой RPMI-1640 доводили концентрацию клеток до 10^7 , после отбирали в шприц и вводили подкожно. Группам вводили клетки в концентрации 10^6 по 100 мкл на одно животное (одному животному 10^6).

Предметом исследования были наночастицы селена, которые вводили для оценки их противоопухолевой активности. Также дополнительно использовали иммуноглобулин imG.

Все животные подвергались обследованию, которое включало в себя клиническое, микробиологическое и лабораторное исследование.

Исследования проводились на мышах, они были разделены на:

1 группа - контрольная состояла из 5 животных- раковые клетки (EPNT-5) вводили подкожно в область холки (10^6 клеток на животное);

2 группа - опытная состояла из 5 животных, которой вводили однократно подкожно онкологические линии клеток EPNT-5 в дозе 10^6 на животное. Затем после введения вводили однократно внутрибрюшинно раствор наночастиц селена в концентрации 0,75 мг/мл в дозе 3 мг/кг массы тела;

3 группа - опытная состояла из 3 животных, которой вводили однократно подкожно онкологические линии клеток EPNT-5 в дозе 10^6 на животное. А также раствор наночастиц селена в концентрации 0,75 мг/мл в дозе 3 мг/кг массы тела и иммуноглобулин imG вводили внутрибрюшинно, 1 раз, сразу же после введения раковых клеток (EPNT-5);

4 группа - опытная состояла из 3 животных, которой вводили однократно подкожно онкологические линии клеток EPNT-5 в дозе 10^6 на животное. А также внутрибрюшинно вводили иммуноглобулин IgG, 1 раз, сразу же после введения раковых клеток (EPNT-5).

2.1.8. Разработка мицеллярного раствора, обладающая гепатопротекторными свойствами, на основе фосфотидилхолина, метионина, витамина Е и селена

Получение мицеллярных растворов осуществляли в 4 стадии. На первой стадии в органическом растворителе (использовался фармакопейный растворитель 2-пирролидон) при температуре 60 °С растворяли фосфотидилхолин и витамин Е, далее в данный раствор добавляли соответствующее поверхностно активное вещество и затем по каплям при постоянной температуре прикапывали раствор воды с метионином, бензиловым спиртом, наночастиц селена размером 2-4 нм стабилизированных поливинилпирролидоном или селенитом натрия.

В таблице 3 приведены составы композиций для подбора оптимальных действующих органических веществ, обладающие устойчивостью. Данные образцы были исследованы методом ДРС определен их д-зет потенциал и размер мицелл.

Таблица 3 – составы композиций, для подбора оптимальных действующих веществ

Номер опыта	фосфотидилхолин (г)	Метионин (г)	Витамин Е (г)	Бензиловый спирт (мл)	ПАВ ТВИН-80 (мл)	Селенит натрия, г	2-пирролидон	Наночастицы селена, г	Вода до 10 мл
01	0,12	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	2,2		6,72
02	0,24	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	6		2,8
03	0,24	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	8		0,8
04	0,36	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	6		2,68
05	0,48	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	6		2,56
06	0,12	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	2,2		6,72
07	0,24	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	3,5		5,3
08	0,36	0,04	0,02	0,1	0,8	0,0011	3,5		5,18
09	0,12	0,04	0,02	0,1	0,4	0,0011	2,2		7,12
10	0,24	0,04	0,02	0,1	0,4	0,0011	6		3,2
11	0,36	0,04	0,02	0,1	0,4	0,0011	6		3,08
12	0,12	0,04	0,02	0,1	0,4	0,0011	2,2		7,12

Продолжение таблицы 3

13	0,24	0,04	0,02	0,1	0,4	0,0011	3,5		5,7
14	0,36	0,04	0,02	0,1	0,4	0,0011	3,5		5,58
15	0,12	0,04	0,02	0,1	0,8		2,2	0,0011	6,72
16	0,24	0,04	0,02	0,1	0,8		6	0,0011	2,8
17	0,24	0,04	0,02	0,1	0,8		8	0,0011	0,8
18	0,36	0,04	0,02	0,1	0,8		6	0,0011	2,68
18	0,48	0,04	0,02	0,1	0,8		6	0,0011	2,56
20	0,12	0,04	0,02	0,1	0,8		2,2	0,0011	6,72
21	0,24	0,04	0,02	0,1	0,8		3,5	0,0011	5,3
22	0,36	0,04	0,02	0,1	0,8		3,5	0,0011	5,18
23	0,12	0,04	0,02	0,1	0,4		2,2	0,0011	7,12
24	0,24	0,04	0,02	0,1	0,4		6	0,0011	3,2
25	0,36	0,04	0,02	0,1	0,4		6	0,0011	3,08
26	0,12	0,04	0,02	0,1	0,4		2,2	0,0011	7,12
27	0,24	0,04	0,02	0,1	0,4		3,5	0,0011	5,7
28	0,36	0,04	0,02	0,1	0,4		3,5	0,0011	5,58

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

Для определения всхожести семян яровой пшеницы брали заранее замоченные семена, которые выдерживали в приготовленных растворах в течении 24 часов на аппарате для встряхивания - шейкер. Использовались растворы такие, как дистиллированная вода на 50 мл и дистиллированная вода с наночастицами селена в 0.0125г. Семена выкладывали на фильтровальную бумагу, где 30 минут подвергались сушке. Далее семена равномерно наносили на полоску фильтровальной бумаги, смоченную дистиллированной водой и заворачивали в рулон. Использовали чашки Петри, в которые помещали данные рулоны и ставили в термошкаф на 25-30 °С, каждые 24-48 часов семена смачивали дистиллированной водой.

Эксперимент длился 10 суток и из него следует получить следующие данные

1. Длина ростков и корней, каждого семя (в мм.)
2. Энергия прорастания семян – это количество проросших семян, которые соответствуют стандарту, корешки, равные половине длины семени и более, а ростки равны длине семени и более
3. Всхожесть – это количество вообще проросших семян деленое на общее количество семян и умноженное на 100%
4. Дружность прорастания – это среднее число проросших семян за сутки, всхожесть деленая на число дней прорастания (в %)

Ход эксперимента

1 сутки

- Подготовка семян

Отобрали семена по пятьдесят штук, разложили в колбы. Подготовили растворы, залили в колбы с семенами. Подписали все экземпляры.

- Загрузили их в аппарат встряхивания – шейкер, на 24 часа

2 сутки

Выгрузили колбы из шейкера. Разложили семена на фильтровальную бумагу, оставили на 30 минут. В это время отрезали пять полос бумаги 6000x150мм. По окончании 30 минут, равномерно разложили семена через каждые 10 мм и аккуратно завернули. После скручивания всех экземпляров, ставили каждый на чашку Петри и подписывали. Смачивали дистиллированной водой и погружали в термошкаф при температуре 25 – 30 Градусов.

3-10 сутки

Достали все образцы из термошкафа. Аккуратно разворачивали бумагу и измеряли росток вместе с корнем, записывали данные в таблицу (количество проросших семян и все размеры). После всех измерений, закручивали обратно и ставили все в термошкаф.

Исследование влияния наночастиц селена на особенности физиологических процессов у проростков яровой ржи на начальных этапах онтогенеза

Для исследования наночастиц на физиологические процессы у проростков было составлено пять групп по 50 семян ржи ярового сорта Волжанка.

Перед началом эксперимента готовили растворы селеноорганических препаратов путем растворения: 0,125 г наночастиц селена синтезированных из диацетофенонилселенида и 0,05 г DAFS-25 в 5 мл изопропанола каждого. Полученные растворы соответствуют содержанию элементарного селена в концентрации 2,5 мг/мл.

Для биологических экспериментов готовили растворы на дистиллированной воде, которые использовались в дальнейших экспериментах:

1 - Дистиллированная вода (50 мл)

2 - Дистиллированная вода (50 мл) + 0,5 мл раствора наночастиц селена

В плоскодонные колбы было насыпано по 50 семян яровой ржи, которые в последствии заливались приготовленными растворами. Семена замачивали на 24 часа, помещая колбы на встряхивающее устройство - шейкер.

Далее семена выкладывали на фильтровальную бумагу и просушивали в течение 30 минут.

После высушивания семян их равномерно распределяли на полоске фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой, затем полоску с семенами заворачивали в рулет. Далее подготовленные семена раскладывали по чашкам Петри и помещали в термостат при температуре 25-30°C. Каждые 1-2 дня семена смачивали дистиллированной водой.

2.1.10. Исследование влияния наночастиц в антирабической вакцине

Исследование влияния наночастиц стабилизированных хитозаном в концентрации 10 мг/мл на иммуногенную активность в антирабической вакцине

Объектом исследования выступали наночастицы селена стабилизированные хитозаном и наночастицы селена стабилизированные поливинилпирролидоном.

Изучение иммунобиологических свойств наночастиц селена стабилизированных поливинилпирролидоном 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» (Рабикан)» серии 80/80.

В три флакона иммунобиологического препарата «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 80/80, внесли физиологический раствор в объеме, соответствующем объему вакцины до высушивания - 10 мл в каждый, тщательно перемешали, объединили и общую пробу использовали для испытаний. Объединенную вакцину разделили на 2 равные части. Каждую часть обозначили как «Проба № 1», «Проба № 2». В первоначальный раствор пробы №2 внесли наночастиц селена размером 4-6 нм стабилизированных хитозаном (концентрация наночастиц селена 10 мг/мл). Из каждой пробы сделали четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

В каждое разведение пробы № 2 добавили наночастицы стабилизированные хитозаном до концентрации 10 мг/мл.

В качестве контрольной пробы использовали пробу №1 не содержащую наночастиц. Так же использовали контрольную референс-вакцину. Флакон ресуспензировали до первоначального объема (10 мл) стерильным физиологическим раствором, обозначили как Пробу № 3. Из тщательно перемешанной пробы сделали на стерильном физиологическом растворе четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

Сформировали 12 групп белых нелинейных мышей по 16 голов в каждой.

Группам 1, 2, 3, 4, внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №1 в соответствующем разведении (группа 1 (n=16) – в разведении 1:5; группа 2 (n=15) - в разведении 1:25; группа 3 (n=15) - в разведении 1:125; группа 4 (n=15) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток).

Группам 5, 6, 7, 8 внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №2 в соответствующем разведении (группа 1 (n=15) – в разведении 1:5; группа 2 (n=15) - в разведении 1:25; группа 3 (n=15) - в разведении 1:125; группа 4 (n=15) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток).

Группам 9, 10, 11, 12 внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №3 в соответствующем разведении (группа 1 (n=15) – в разведении 1:5; группа 2 (n=15) - в разведении 1:25; группа 3 (n=15) - в разведении 1:125; группа 4 (n=15) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток).

На 7 сутки после ревакцинации мышам всех групп ввели интрацеребрально по 0,03 см³ разрешающую дозу тест-штамма CVS, содержащую по предварительному титрованию 5-50 LD₅₀/0,03 см³. Так же, вирус ввели 10 интактным белым нелинейным мышам для контроля вируса. Наблюдали за инфицированными мышами 14 суток. На основании полученных результатов по методу Рида и Менча рассчитывали иммуногенную активность используемых опытных образцов вакцины РАБИКАН.

Исследование влияния наночастиц стабилизированных поливинилпирролидоном в концентрации 3 мг/мл и 0,3 мг/мл, на иммуногенную активность в антирабической вакцине «Рабикан» на лабораторных животных

В три флакона иммунобиологического препарата «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 90/39, внесли физиологический раствор в объеме, соответствующем объему вакцины до высушивания - 10 мл в каждый, тщательно перемешали, объединили и общую пробу использовали для испытаний. Объединенную вакцину разделили на 3 равные части. Каждую часть обозначили как «Проба № 1», «Проба № 2», «Проба № 3». В первоначальный раствор пробы №2 внесли наночастиц селена размером 4-6 нм стабилизированных хитозаном (концентрация наночастиц селена 3 мг/мл). Из каждой пробы сделали четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

В каждое разведение пробы № 2 добавили наночастицы стабилизированные ПВП до концентрации 3 мг/мл.

В первоначальный раствор пробы №3 внесли наночастиц селена размером 4-6 нм стабилизированных хитозаном (концентрация наночастиц селена 0,3 мг/мл). Из каждой пробы сделали четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

В каждое разведение пробы № 2 добавили наночастицы стабилизированные ПВП до концентрации 0,3 мг/мл.

В качестве контрольной пробы использовали пробу №1 не содержащую наночастиц. Так же использовали контрольную референс-вакцину. Флакон ресуспензировали до первоначального объема (10 мл) стерильным физиологическим раствором, обозначили как Пробу № 4. Из тщательно перемешанной пробы сделали на стерильном физиологическом растворе четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

Сформировали 16 групп белых нелинейных мышей по 16 голов в каждой.

Группам 1, 2, 3, 4, внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №1 в соответствующем разведении (группа 1 (n=16) – в разведении 1:5; группа 2 (n=16) - в разведении 1:25; группа 3 (n=16) - в разведении 1:125; группа 4 (n=16) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток).

Группам 5, 6, 7, 8 внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №2 в соответствующем разведении (группа 1 (n=16) – в разведении 1:5; группа 2 (n=16) - в разведении 1:25; группа 3 (n=16) - в разведении 1:125; группа 4 (n=16) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток).

Группам 9, 10, 11, 12 внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №3 в соответствующем разведении (группа 1 (n=16) – в разведении 1:5; группа 2 (n=16) - в разведении 1:25; группа 3 (n=16) - в разведении 1:125; группа 4 (n=16) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток);

Группам 13, 14, 15, 16 внутрибрюшинно, двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 0,5 см³ ввели пробу №4 в соответствующем разведении (группа 1 (n=16) – в

разведении 1:5; группа 2 (n=16) - в разведении 1:25; группа 3 (n=16) - в разведении 1:125; группа 4 (n=16) - в разведении 1:625), ревакцинация через 7 суток)

На 7 сутки после ревакцинации мышам всех групп ввели интрацеребрально по 0,03 см³ разрешающую дозу тест-штамма CVS, содержащую по предварительному титрованию 5-50 LD₅₀/0,03 см³. Так же, вирус ввели 10 интактным белым нелинейным мышам для контроля вируса. Наблюдали за инфицированными мышами 14 суток. На основании полученных результатов рассчитывали иммуногенную активность используемых опытных образцов вакцины «Рабикан» по методу Рида и Менча описанному выше.

Исследование влияния наночастиц стабилизированных поливинилпирролидоном в концентрации 0,3 мг/мл на иммуногенную активность в антирабической вакцине «Рабикан» на лабораторных животных

В три флакона антирабической вакцины под названием «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 90/80, внесли физиологический раствор в объеме, соответствующем объему вакцины до высушивания, тщательно перемещали, объединили и общую пробу использовали для испытаний. Объединенную вакцину разделили на 2 равные части. Каждую часть обозначили как «Проба № 1», «Проба № 2». Из каждой пробы сделали четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. В каждое разведение пробы № 2 добавили наночастицы стабилизированных поливинилпирролидоном до концентрации наночастиц 0,3 мг/мл.

Контрольная проба вакцины без наночастиц Проба № 1. Ресуспензировали флакон с референс-вакциной до первоначального объема стерильным физиологическим раствором, обозначили как Пробу № 3. Из тщательно перемешанной пробы сделали на стерильном физиологическом растворе четыре последовательных разведения с пятикратным шагом 1:5, 1:25, 1:125, 1:625.

Каждую пробу ввели внутривенно по 0,5 см³ 15 белым мышам каждого разведения (цельное, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625). Через 7 дней провели вторую вакцинацию.

На 7 сутки после второй вакцинации мышам ввели интрацеребрально по 0,03 см³ разрешающую дозу тест-штамма CVS, содержащую по предварительному титрованию 5-50 LD₅₀/0,03 см³. Так же, вирус ввели 10 не вакцинированных белым мышам для контроля вируса. Наблюдали за инфицированными мышами 14 суток. На основании полученных результатов по методу Рида и Менча рассчитывали дозу вируса в опыте.

Определение безвредности в антирабической вакцине наночастиц стабилизированных поливинилпирролидоном с концентрацией 0,3 мг/мл

Восстановленную до исходного объема стерильной дистиллированной водой вакцину под названием «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 90/39, из пяти флаконов, после тщательного смешивания в одной емкости до первоначального объема 50 мл и вносили 0,01 г наночастиц селена стабилизированных поливинилпирролидоном, после тщательного смешивания в одной емкости вводили по 0,5 см³ в область подкожной клетчатки спины 10 мышам.

Определение безвредности в антирабической вакцине наночастиц стабилизированных хитозаном в концентрации 10 мг/мл

Восстановленную до исходного объема стерильной дистиллированной водой вакцину под названием «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 9039, из пяти флаконов, после тщательного смешивания в одной емкости до первоначального объема 50 мл и вносили 0,5 г наночастиц селена стабилизированных поливинилпирролидоном, после тщательного смешивания в одной емкости вводили по 0,5 см³ в область подкожной клетчатки спины 10 мышам.

Определение безвредности в антирабической вакцине стабилизированных поливинилпирролидоном в концентрации 3 мг/мл и 0,3 мг/мл

Восстановленную до исходного объема стерильной дистиллированной водой вакцину под названием «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 9039, из пяти флаконов, после тщательного смешивания в одной емкости до первоначального объема 50 мл, делили полученный объем на две равные части и в первую часть вводили 0,075 г наночастиц, а во вторую 0,008 г и вводили по 0,5 см³ в область подкожной клетчатки спины 10 мышам первую часть и вторую часть аналогично 10 мышам.

2.1.11. Определение полноты протекания реакции методом тонкослойной хроматографии

Для проведения анализа полноты реакции селеноорганических соединений при получении наночастиц селена применялся метод тонкослойной хроматографии с использованием пластин на алюминиевой подложке с нанесённым рабочим слоем фракционированного широкопористого силикагеля с толщиной 90-120 мкм, закреплённого специальным связующим компонентом (Sorbfil, Россия), на которые наносили исследуемый раствор. За стандартный раствор брали соответствующее селеноорганическое соединение для определения полноты протекания реакции. Пластины погружали в элюент, который являлся подвижной фазой и состоял из раствора – гексана, диэтилового эфира и хлороформа в отношении 3:1:1. После проведения хроматографирования, для проявления использовали йодную камеру куда помещали пластины после высушивания на 30 секунд. Далее рассчитывали показатель R_f.

2.1.12. Определение размера наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии

Приготовление сеток с подложкой осуществлялось предварительной их промывкой ацетоном и дальнейшем высушиванием в термостате при 37 °С. При многократном использовании сеток необходимо было проводить их очистку в 25% растворе аммиака из расчета 15 мл раствора на 200 сеток, промывку осуществляли

до того пока раствор не станет светло синим, далее раствор аммиака отделялся от сеток и промывали 10 раз дистиллированной водой, для предотвращения появления коричневых пятен на сетках. Далее промывали дважды в ацетоне и высушивали на фильтровальной бумаге в термостате при 37 °С.

Изготовление пленок делают на предметных стеклах. Поверхность стекла должна быть чистой и ровной, любые трещинки или неровности на поверхности стекла будут вызывать дефекты в формварной пленке. Чтобы не осталось частиц пыли, стекло следовало протереть бумагой для протирки объективов.

Чистое предметное стекло опускалось в бюкс с хлороформом на 30 секунд, затем вынималось, вытирали нижним ребром о фильтровальную бумагу и тем же концом погружали в раствор формвара в хлороформе на 30 секунд. При этом нельзя трясти бюкс, иначе пленка получится неоднородной. Стекло вытаскивали. Далее следовало соскоблить формварную пленку по краям стекла, срезав скальпелем или острым лезвием по 3-5 мм с краев, которые погружались в раствор формвара. Данная процедура облегчает отсоединение пленки от стекла, поскольку иначе пленка цепляется за острые края и может не отойти или порваться.

Тем же концом предметное стекло с пленкой медленно погружалось под углом примерно 45° в широкую емкость (стакан), наполненную дистиллированной водой. При медленном погружении стекла пленка постепенно переходила на поверхность воды. Для лучшей визуальной фиксации пленки дополнительно используют черный фон и яркое освещение.

Толщина получаемой пленки колеблется около 70 нм, на поверхности воды она будет в виде серебристо-белого прямоугольника. На эту пленку аккуратно выкладывали электронно-микроскопические сеточки (желательно одинаковой, например, блестящей стороной кверху).

Следовало оставлять небольшой зазор между соседними сеточками и избегать наложения сеточек друг на друга, которое может привести к разрыву формварной пленки. Когда вся пленка покрыта сеточками, сверху аккуратно накладывали покровное стекло либо кусочек ламинированной бумаги, пленка с сетками прилипает к нему, и вытаскивается из воды, помещали в чистую чашку

Петри покрывным стеклом вниз. После высыхания, сеточки с пленкой готовы к использованию. Качество полученной формварной пленки проверяли под микроскопом на небольших увеличениях. Хорошая пленка должна быть без разрывов и грязи и не должна рваться под сфокусированным пучком электронов при вытаскиваемой объективной диафрагме.

Для определения размера наночастиц, проводили предварительную очистку от избыточных ПАВ. Далее на предварительно подготовленные сетки с подложкой наносили раствор наночастиц в объеме 5-6 мкл. После высушивания образца проводили детектирование в электронном просвечивающем микроскопе Zeiss Libra 120 ускоряющее напряжение 120 кВ, тип катода – вольфрамовый, диапазон увеличений собственно ТЕМ: $\times 80$ – $\times 630\,000$, плюс увеличение камеры.

2.1.13. Определение размера наночастиц при помощи метода динамического рассеяния света

Один из методов определения размера наночастиц - это измерение размеров с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС).

Для исследования размера наночастиц методом ДРС, предварительно готовили растворы наночастиц с заданной концентрацией (обычно 2-4 раствора с различием в концентрации в 10 раз) в дистиллированной воде или другом растворителе.

Процесс измерения наночастиц осуществляли, используя кюветы Sarstedt Aktiengesellschaft & Go D-51588 (made in Germany) 10x10x45 мм с исследуемым раствором, который помещали в кюветное отделение анализатора.

Свет от лазера проходил через раствор, рассеивается на полимерных молекулах или дисперсных частицах, имеющих в растворе. Рассеянный свет принимается системой счета фотонов, сигнал с выхода которой подается на вход коррелятора. Коррелятор накапливает корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света.

По завершении выбранного времени измерения корреляционная функция передавалась в компьютер. Компьютер рассчитывал размер частиц или

молекулярный вес полимерных молекул, обрабатывая измеренную корреляционную функцию (Рисунок 6-7).

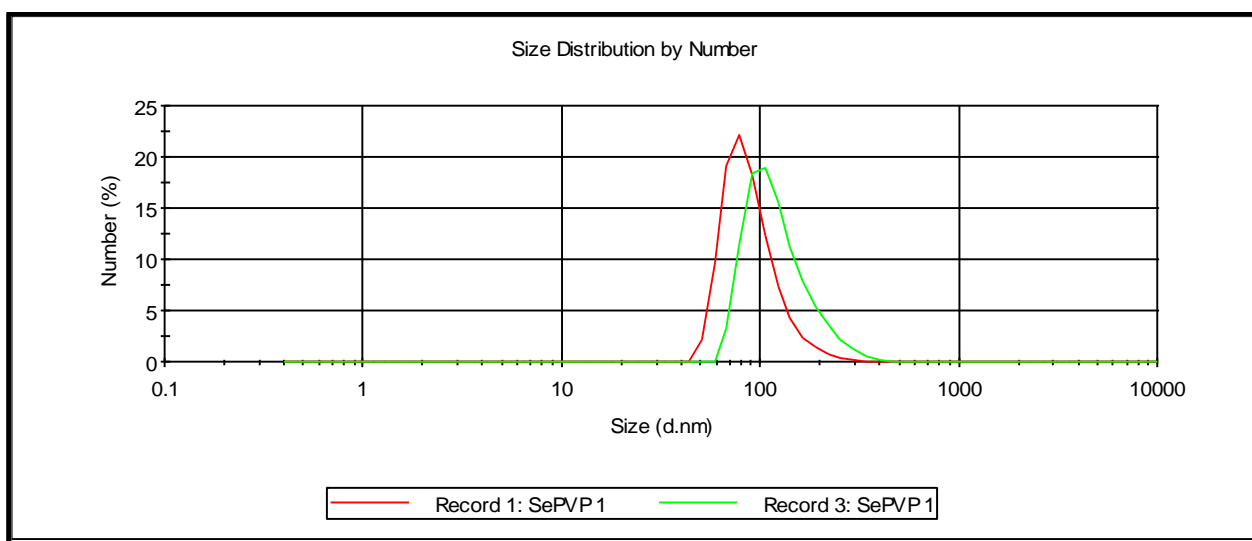


Рисунок 6 – Пример распределения размеров по номерам

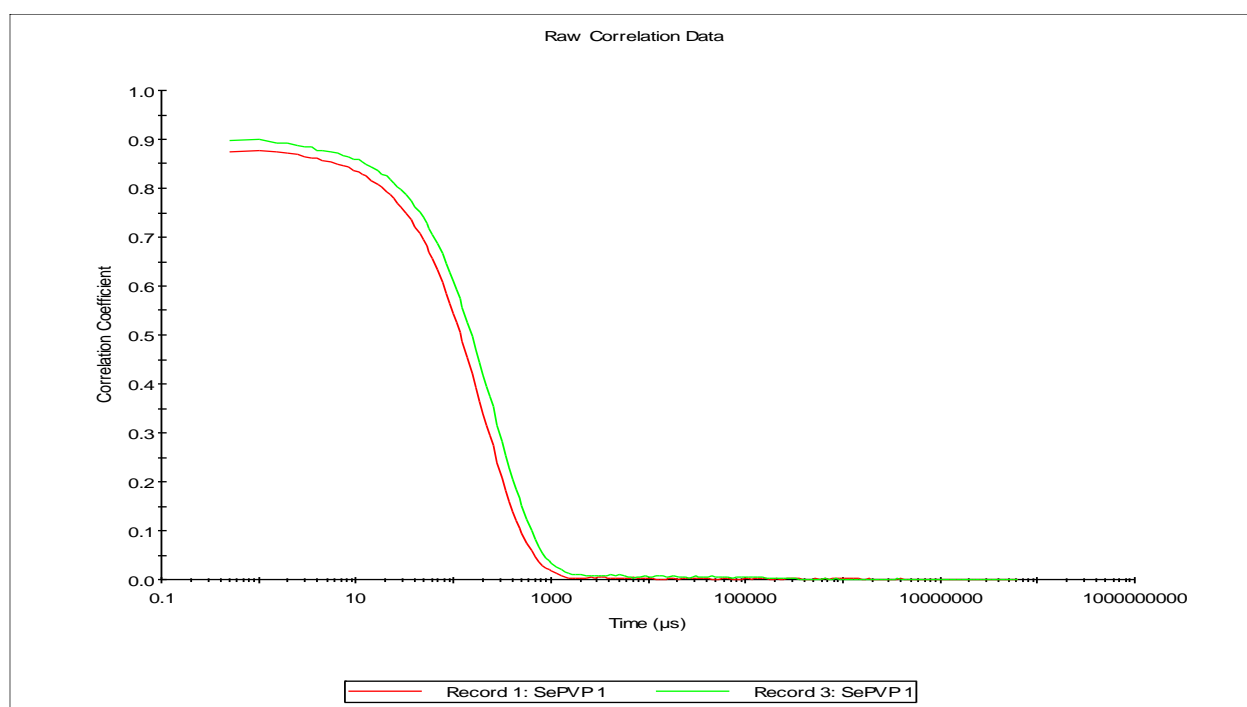


Рисунок 7 – Пример необработанных данных корреляции

Данный метод позволяет с точностью определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее, из коэффициента диффузии рассчитывается радиус наночастиц.

2.1.14. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным процедурам, с помощью приложения Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corp. USA) и пакета статистического анализа данных StatPlus 2009 professional 5.8.4 for Windows (StatSoftInc., USA), с использованием t-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между массивами данных. По результатам вычисления среднеарифметического значения и стандартного отклонения для данной каждой выборки определяли стандартную ошибку и границы доверительного интервала при уровне значимости 95% ($p = 0,05$).

Различия считали достоверными при выполнении неравенства $p \geq 0,05$. Кроме того, в этих случаях контролировали также соблюдение неравенства $t, t(n, p)$ при $n = (df + 1)$ (где df – число степеней свободы), $p = 0,05$, где $t = |x_1 - x_2| / (s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$, x_1 и x_2 – среднеарифметические значения, s_1 и s_2 – их стандартные ошибки для двух выборок экспериментальных данных.

Различия определяли при $p \leq 0,05$ уровне значимости.

Цифровой материал представляется в единицах СИ, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения и стандартом СЭВ 1062-78.

2.2. Результаты исследований и их обсуждение

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. Так как у коллектива имелся опыт синтеза селеноорганических соединений в первую очередь началось рассмотрение имеющихся в «арсенале» соединений, в частности: селенопиранов, солей селенопирилия, селеноциклогексанов, селенпентан-1,5-дионон, селенохромонов, солей селенохромилия и селенофенов. При этом было установлено, что в большинстве своем данные соединения аналогично солям селенистой кислоты обладают слишком высокой стабильностью и только диацетофенонилселенид позволял, 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.

2.2.1. Синтез селеноорганических соединений

2.2.1.1. Синтез дихлордиацетофенонилселенида

Синтез дихлордиацетофенонилселенида проводили в условиях кислотного катализа в присутствии этилового эфира уксусной кислоты в реакции ацетофенона с селенистой кислотой. Далее полученные кристаллы отфильтровывались и промывались. Чистоту полученного соединения определяли по ТСХ и температуре плавления. R_f (дихлордиацетофенонилселенида) = 0,9, температура плавления – 76-77 °С.

2.2.1.2. Синтез диацетофенонилселенида

Синтез диацетофенонилселенида осуществляли в реакции восстановления дихлордиацетофенонилселенида сульфитом натрия. Чистоту полученного соединения определяли по ТСХ и температуре плавления. R_f (диацетофенонилселенида) = 0,76, температура плавления – 68-72°С.

2.2.2. Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида

Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинилпирролидоном

Сущность реакции заключалась в создании щелочной среды. Находясь в подобной среде, происходит разложение 1,5 дикетонов, представителем которых является диацетофенонилселенид с выделением селена, который стабилизируется поверхностноактивным веществом растворённом в среде. В результате получался порошок, бледно желтого цвета (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Порошок наночастиц селена с поливинилпирролидоном

Данная субстанция стабильна, водорастворима 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. Определение размера наночастиц на просвечивающем электронном микроскопе показало частицы в диапазоне 2-4 нм (Рисунок 9).

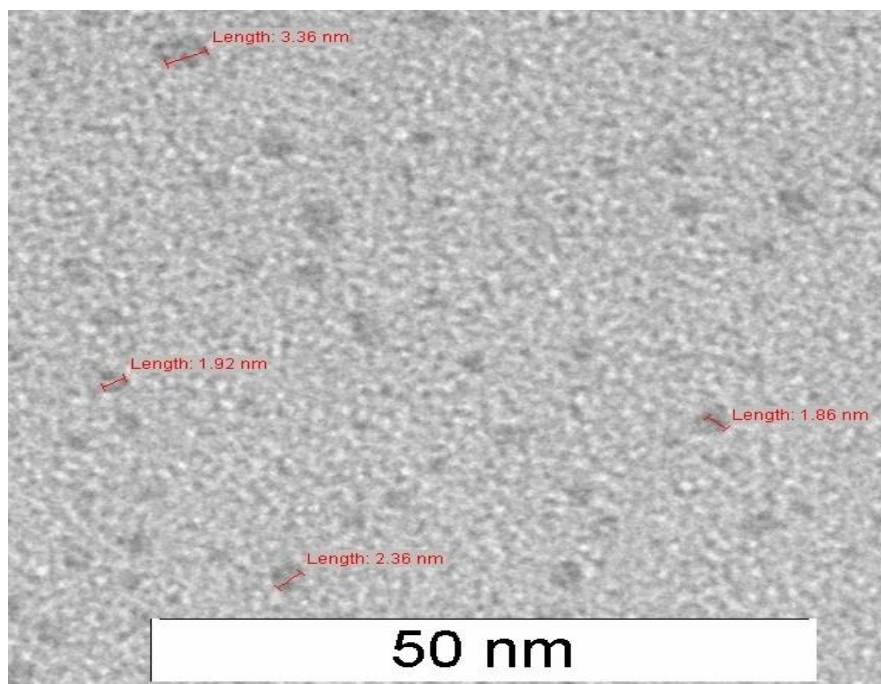


Рисунок 9 – Электронно-микроскопические пленки наночастиц селена с поливинилпирролидоном размером

Для исследования размера наночастиц селена методом динамического рассеяния света 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, 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 при анализе методом ДРС от 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл.

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 (Рисунок 10), 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 (Рисунок 11) 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 (Рисунок 12), а в диметилсульфоксиде размер частиц составлял от 190 до 396 нм (Рисунок 13), 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.

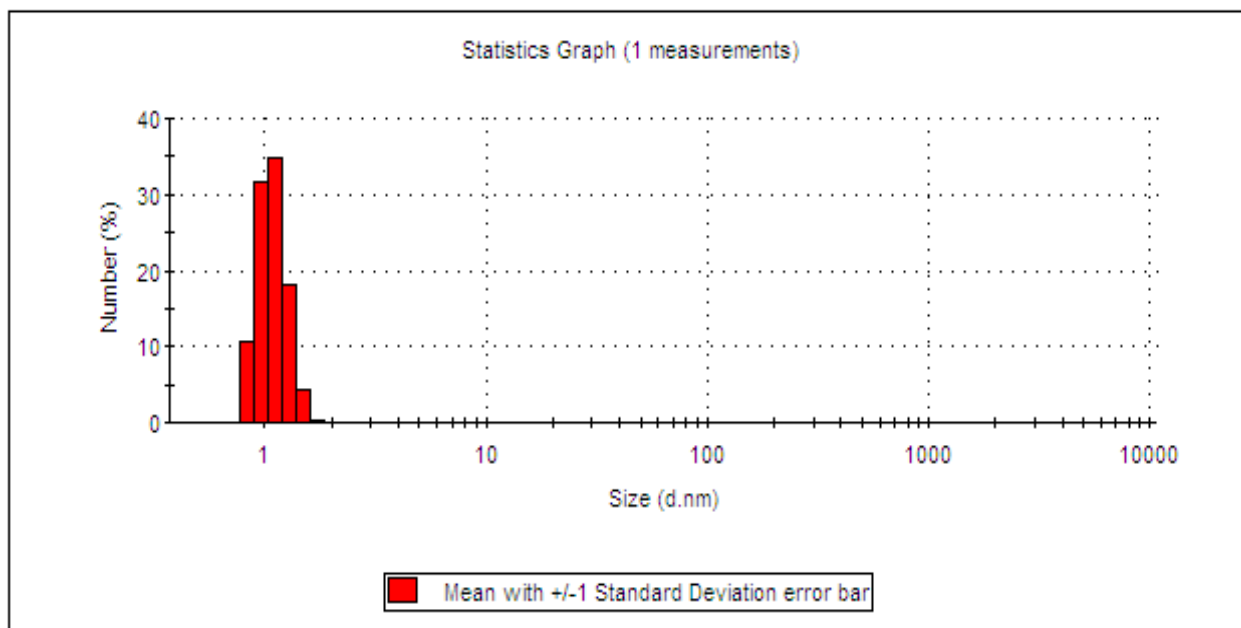


Рисунок 10 – 0,1 mg/ml (слева) наночастицы селена стабилизированных ПВП в воде. Диаграмма распределения частиц по числу

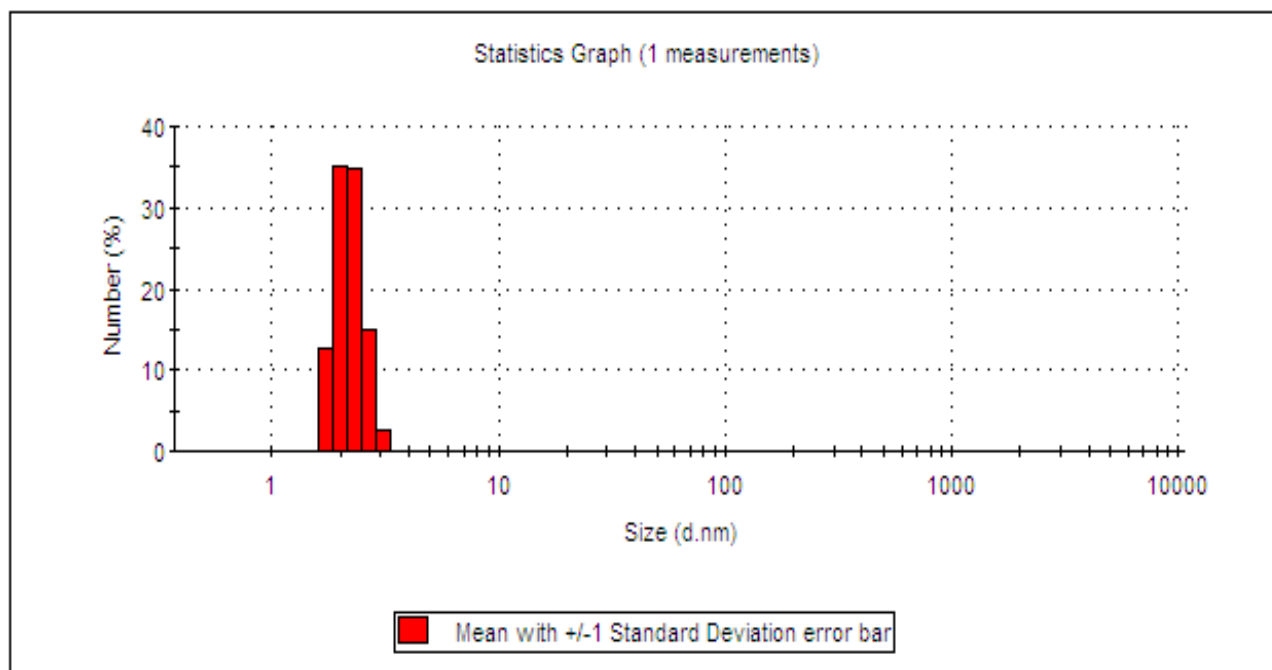


Рисунок 11 – 0,0001 мг/мл (справа) наночастиц селена стабилизированных ПВП в воде. Диаграмма распределения частиц по числу

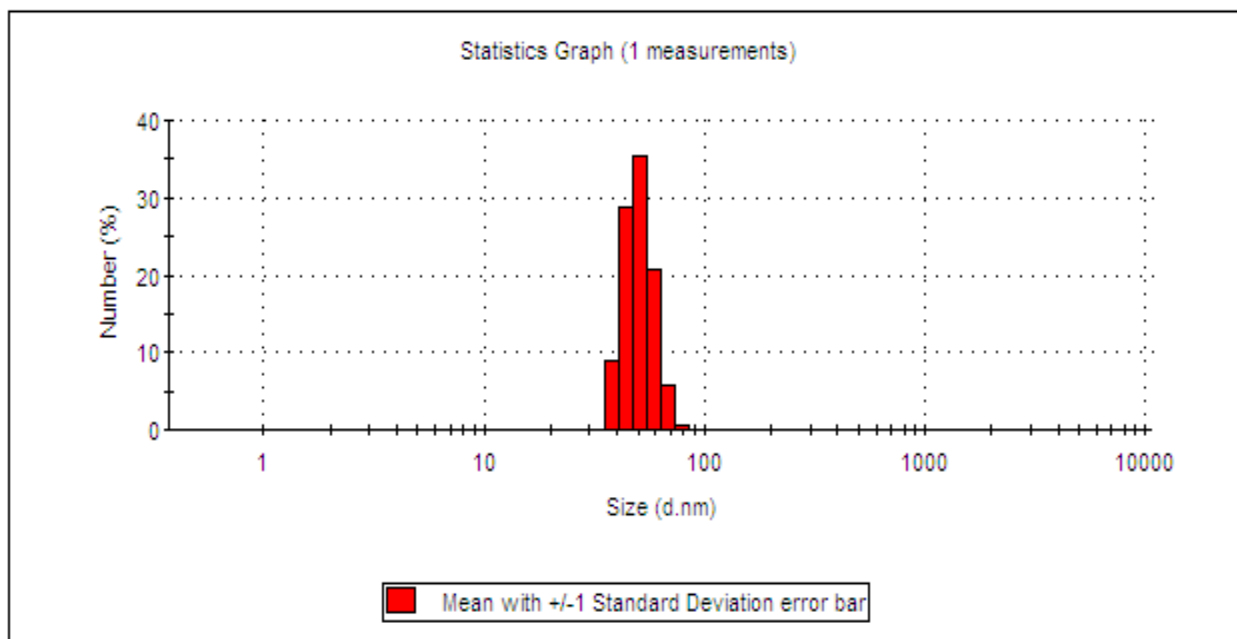


Рисунок 12 – 0,001 mg/ml (справа) наночастиц селена стабилизированных ПВП в воде. Диаграмма распределения частиц по числу

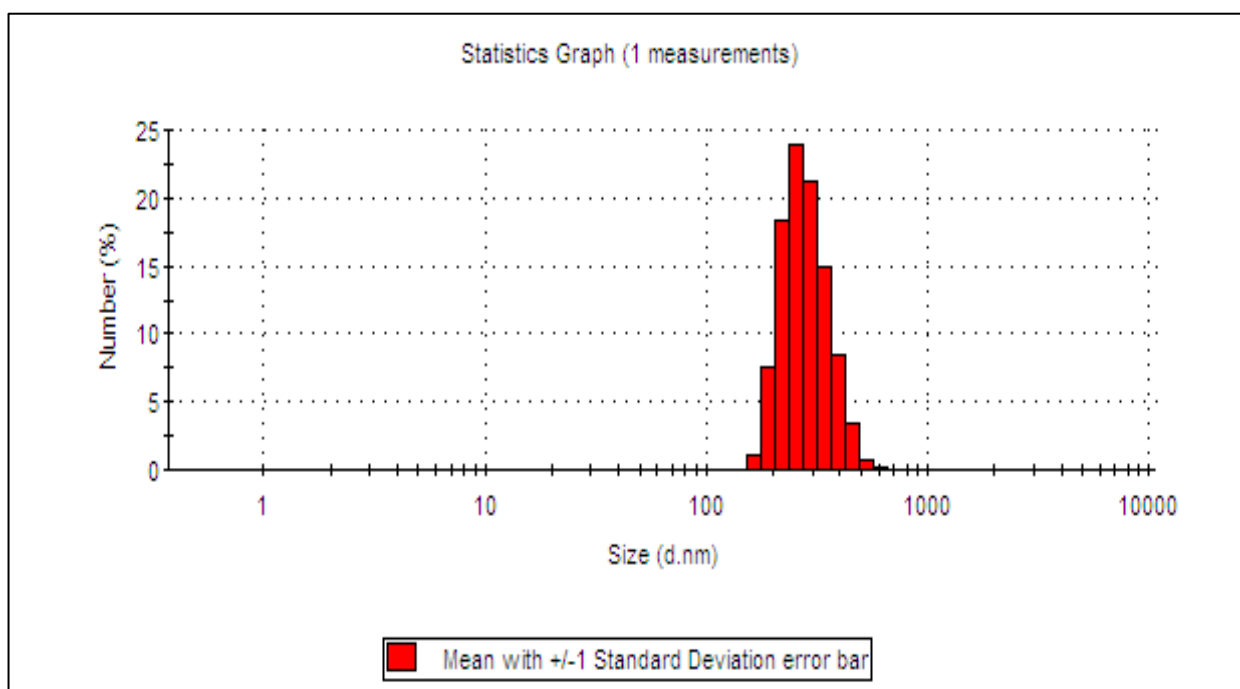


Рисунок 13 – 0,01 мг/мл (справа) наночастиц селена стабилизированных ПВП в ДМСО. Диаграмма распределения частиц по числу

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. Однако 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 особенно не дает представления о размере частиц в растворе и влиянии растворителя.

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

Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных Кремофор А-25

Была разработана методика получения 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.

В воде растворяли Кремофор А-25 в разных концентрациях, после растворения Кремофор А-25 капельным методом добавляли восстановитель (раствор 1). Параллельно растворяли дихлордиацетофенонилселенид в бензоле (раствор 2). При температуре 60 °С для лучшей гомогенизации и образования наночастиц на разделе фаз в раствор 1 постепенно при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, вносили раствор 2. Для определения оптимального соотношения Кремофора А-25, аммиака, дихлордиацетофенонилселенида и бензола были выполнены эксперименты при их различной концентрации.

После прохождения реакции для стабилизации наночастиц раствор полностью лиофилизировали. Установлено, что при повышенной температуре наблюдается выпадения осадка, что свидетельствует об образовании микро и макрочастиц. Для оптимизации метода синтеза нами была предпринята попытка синтеза данных наночастиц при температуре 24°С и было установлено, что данная

реакция приводит к образованию раствора без выпадения осадка, однако при перемешивании происходит заметное изменение цвета, раствор синтеза становится красным.

Без перемешивания в процессе синтеза цвет жидкости оставался прозрачным. Изменение цвета происходит лишь спустя продолжительный период времени через 7 суток, раствор также приобретал красный оттенок.

Определение размера наночастиц на просвечивающем электронном микроскопе показало частицы в диапазоне от 16 до 30 нм (Рисунок 14).

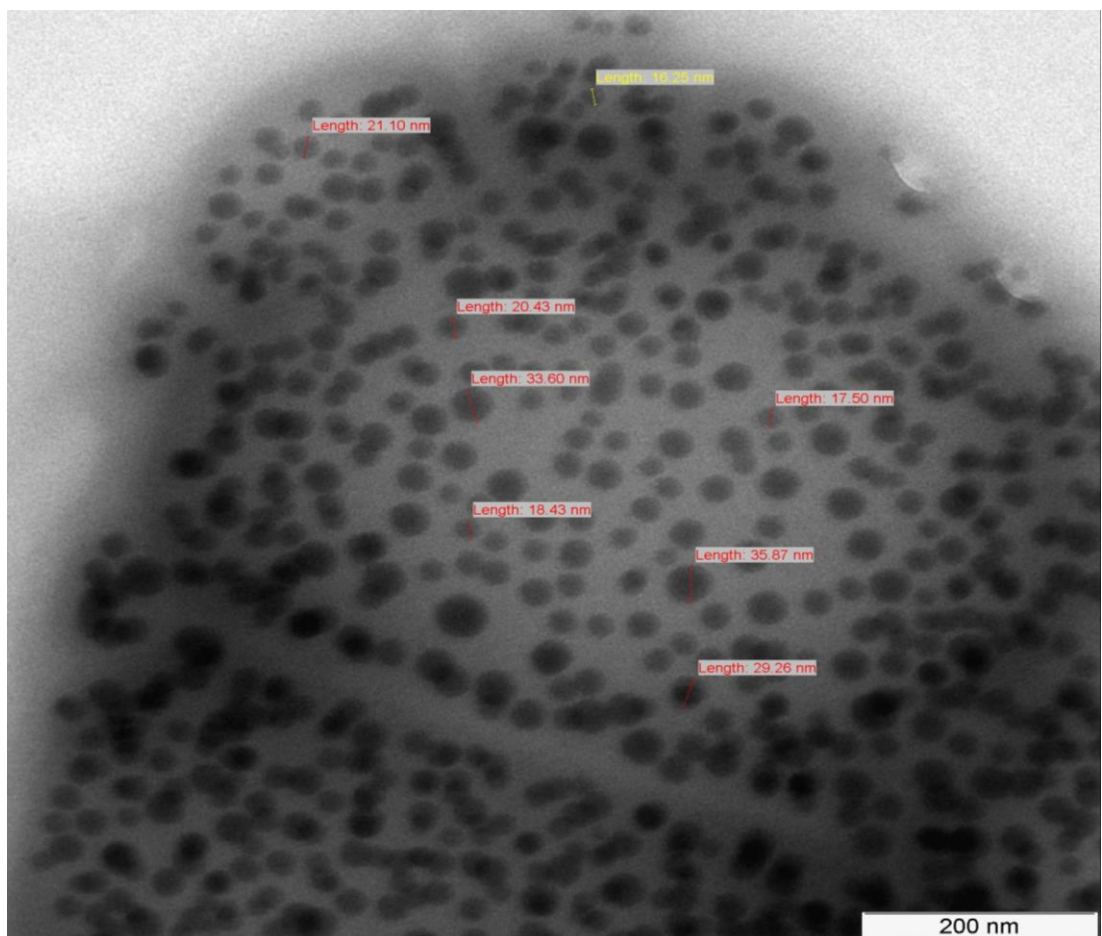


Рисунок 14 – Размер наночастиц в диапазоне от 16 до 30 нм на эл. микроскопе стабилизированных Кремофор А-25

Средний размер наночастиц селена при измерении на анализаторе динамического рассеяния света показал 9,86 нм, где размер наночастиц составлял от 6 до 18,2 нм (Рисунок 15).

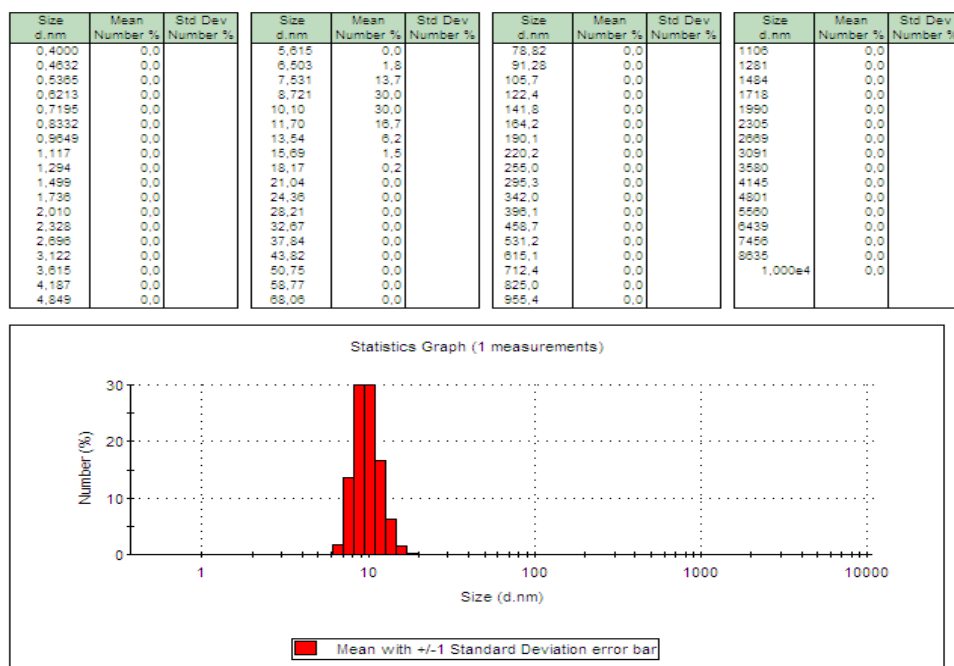


Рисунок 15 – Измерение наночастиц стабилизированных Кремофор А-25 с аммиаком при повышенной температуре.

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 связи с слишком высокой реакционной способностью аммиака и не возможностью получения стабильных наночастиц заданного размера, был проведен ряд синтезов наночастиц с использованием сульфата аммония, в рамках предположения, что использование соли и смещение рН среды в нейтральную возможно способствовало бы получению наночастиц селена. Проведенный ряд экспериментов по синтезу наночастиц из дихлордиацетофенонилселенида при температуре 24 °С в среде Кремофор А-25 сульфатом аммония показал, что реакция образования селена, приводит к образованию раствора без осадка, что свидетельствует об образовании частиц меньшего размера, чем в синтезе с использованием аммиака, данные результаты хорошо коррелируются с тем, что

дихлодиацетофенонилселенид менее стабилен в щелочных средах, что и способствовало его более быстрому разложению и образованию не стабильных коллоидных систем содержащих селен.

Проведение синтеза наночастиц без перемешивания позволило наблюдать прозрачную жидкость с четко видимой границей разделения фаз.

При проведении синтеза при перемешивании привело к образованию прозрачного раствора, без выпадения осадка, и появлению небольшого образования пены, что наиболее вероятно было связано с применением поверхностно активных веществ для стабилизации образующихся наночастиц.

Без перемешивания при длительной выдержке (около недели) раствор оставался прозрачным, появлялся небольшой красноватый оттенок. Выпадения осадка не наблюдалось.

При перемешивании также через 7 суток наблюдалась прозрачная жидкость красного оттенка без выпадения осадка.

Размер наночастиц при анализе ДРС составил от 15 до 33 нм (Рисунок 16). Средний размер 20,98 нм.

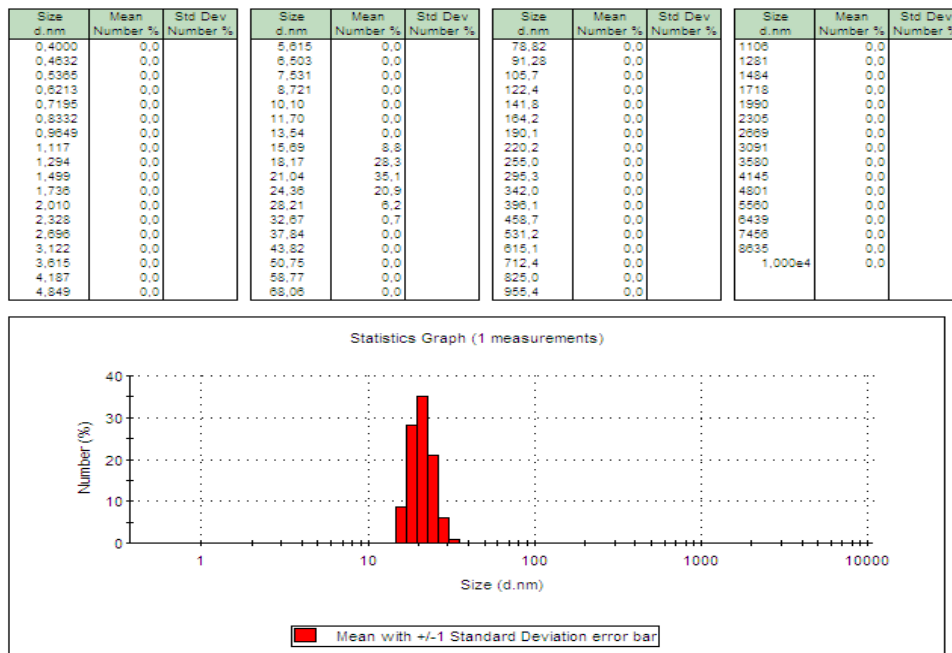


Рисунок 16 – Измерение образца наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25 с сульфатом аммония. Диаграмма распределения частиц по числу

Для получения более однородных наночастиц селена по размеру нами была предпринята попытка синтеза их с использованием вместо сульфата аммония и аммиака - метионина, который обладает меньшей реакционной способностью и не смещает РН раствора в щелочную среду. Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида при температуре 24 °С в среде Кремофор А-25 с метианином показал, что реакция образования селена, приводит к образованию раствора без осадка, сразу же после перемешивания цвет синтеза становится красным.

Без перемешивания в ходе реакции наблюдалась прозрачная жидкость с четкой границей разделения на фазы.

При перемешивании наблюдалась светлая, не прозрачная жидкость с небольшим образованием пены.

При перемешивании, как и без перемешивания, по истечению 7 суток наблюдалась прозрачная жидкость красноватого оттенка без выпадения осадка. По ТСХ было обнаружено наличие дихлордиацетофенонилселенида, что свидетельствовало не полному протеканию реакции. Однако данный реакционный раствор был лиофилизирован и в дальнейшем при анализе методом ДРС установлено образование наночастиц селена размером от 18 до 59 нм (Рисунок 17). Средний размер 28,37 нм.

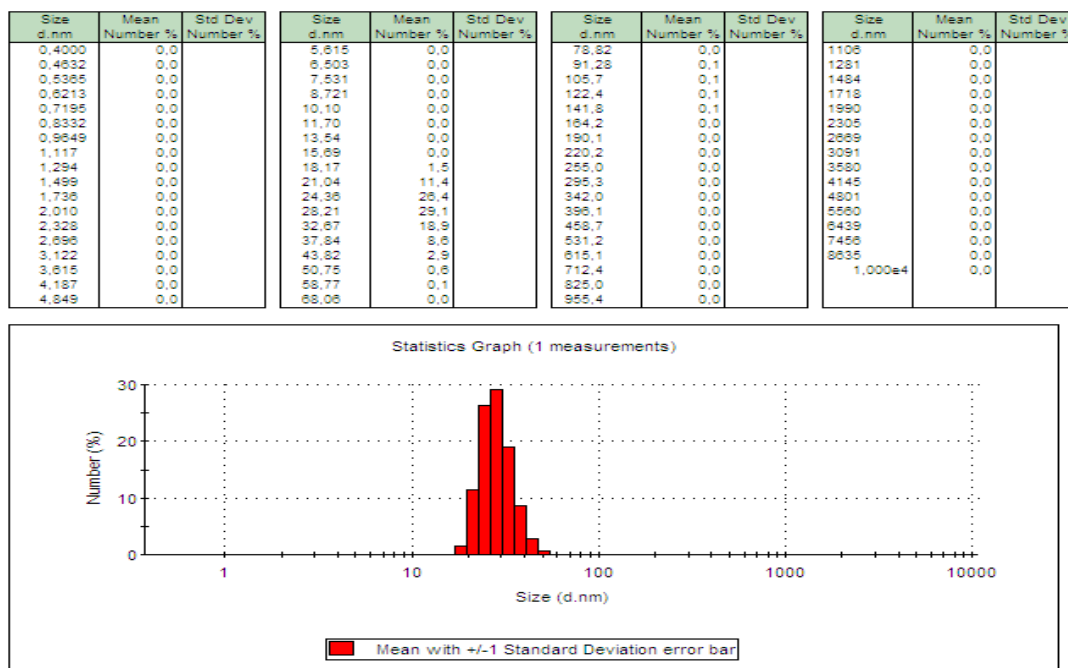


Рисунок 17 – Измерение наночастиц селена дихлордиацетофенонилсенида стабилизированных Кремофор А-25 с метианином. Диаграмма распределения частиц по числу

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 °С 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 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 (Рисунок 18). 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.

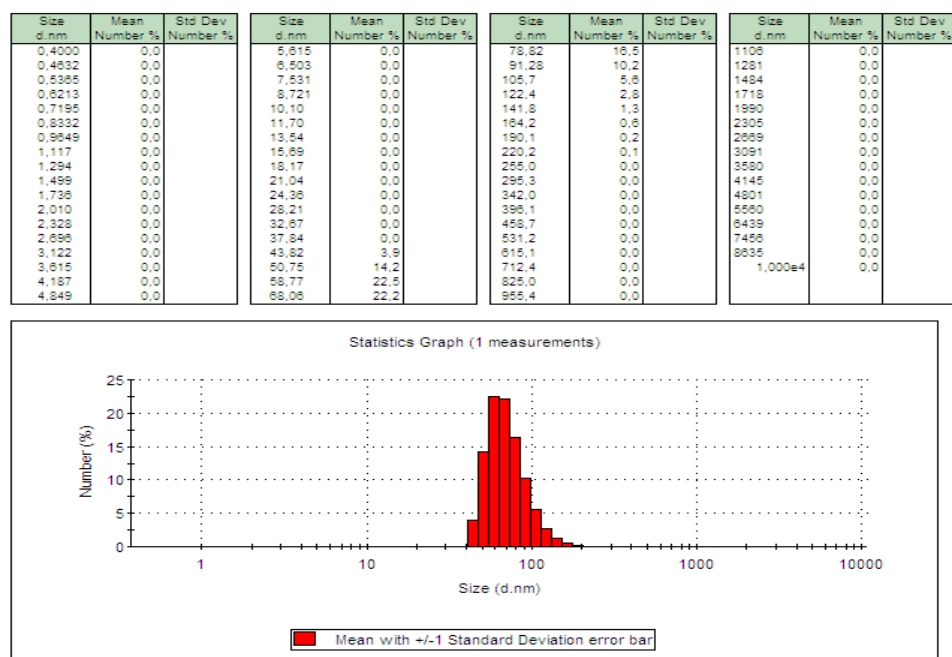


Рисунок 18 – Измерение наночастиц селена стабилизированных Кремофор А-25 с аскорбиновой кислотой. Диаграмма распределения частиц по числу

2.2.3. Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида стабилизированных ХИТОЗАНОМ

Получение наночастиц селена стабилизированных хитозаном проводили в аналогичных условиях в реакции диацетофенонилселенида щелочной среде. Находясь в подобной среде, происходило выделение селена, который стабилизировался хитозаном растворённом в среде. В результате получалась после лиофильного высушивания масса (Рисунок 19-20), 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.



Рисунок 19 – Порошок адсорбированных на хитозане наночастиц селена до измельчения



Рисунок 20 – Порошок адсорбированных на хитозане наночастиц селена после измельчения

Данная форма является удобной как для перорального, так и для парентерального введения. Определение размера наночастиц на просвечивающем

электронном микроскопе показало частицы в диапазоне от 3,5 до 6 нм (Рисунок 21).

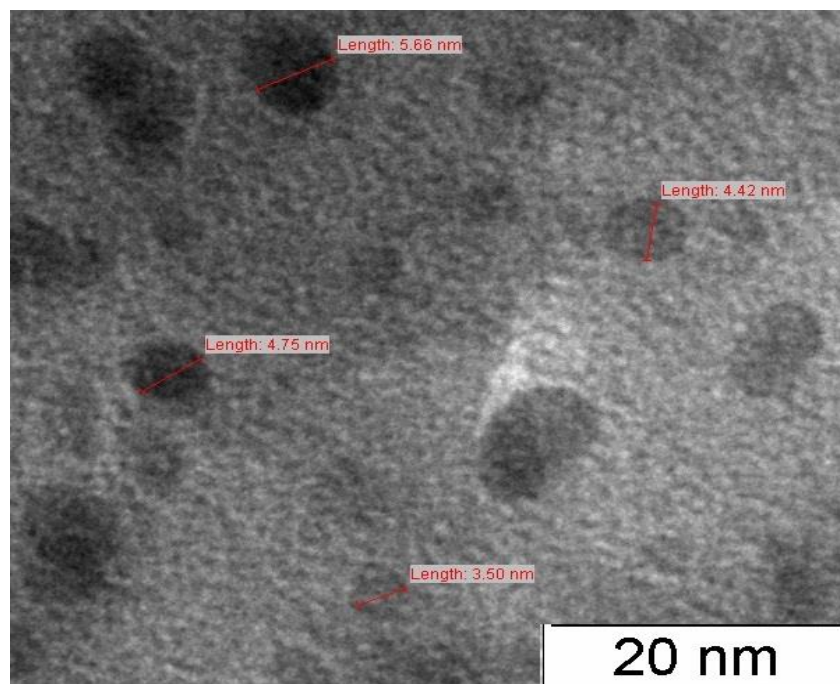


Рисунок 21 – Электронно-микроскопические пленки наночастиц селена стабилизированных хитозаном в диапазоне от 3,5 до 6 нм

При исследовании размера наночастиц с помощью динамического рассеяния света было установлено, что размер составляет в интервале от 43 до 255 нм. (Рисунок 22), 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.

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	15,1		1105	0,0	
0,4632	0,0		6,503	0,0		91,28	9,2		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	0,0		105,7	5,0		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	2,8		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	1,3		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,8		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,3		2669	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,2		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,1		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,0		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	0,0		531,2	0,0		7466	0,0	
3,122	0,0		43,82	4,8		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	16,1		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	23,5		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,08	21,4		955,4	0,0				

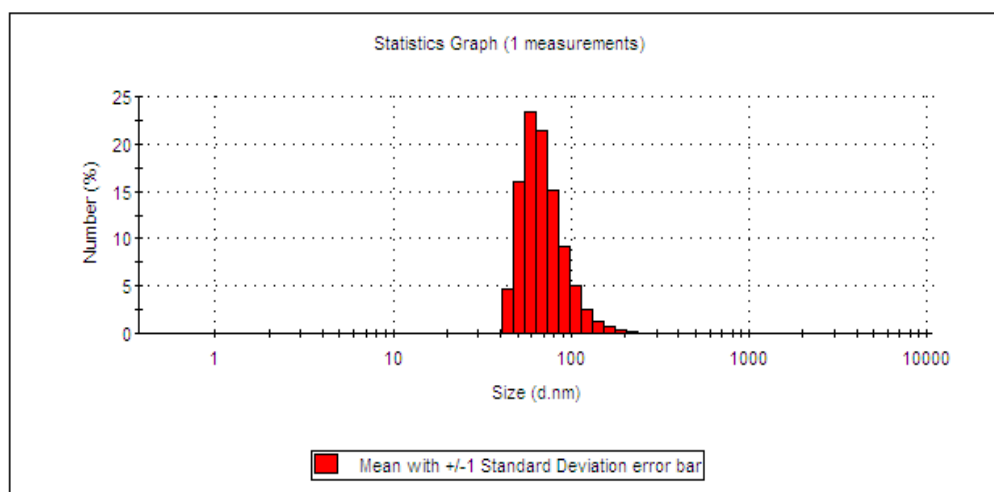


Рисунок 22 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида стабилизированных хитозаном. Диаграмма распределения частиц по числу

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C стабилизированных ПВП под воздействием аммиака

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. (Рисунок 23). Средний размер 80,27 нм.

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,815	0,0		78,82	17,0		1108	0,0	
0,4632	0,0		6,503	0,0		91,28	11,9		1281	0,0	
0,5385	0,0		7,531	0,0		105,7	7,5		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	4,5		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	2,8		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	1,5		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,9		2689	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,6		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,3		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,2		4145	0,0	
1,738	0,0		24,36	0,0		342,0	0,1		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,0		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	0,0		531,2	0,0		7458	0,0	
3,122	0,0		43,82	2,8		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	10,9		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	18,8		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,06	20,4		955,4	0,0				

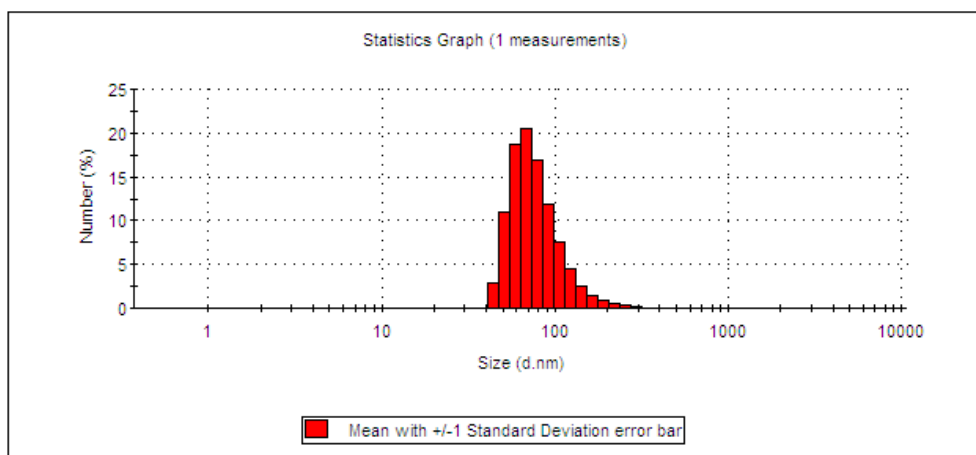


Рисунок 23 – Измерение наночастиц селена из диацетофенилселенида при температуре 25°C стабилизированных ПВП под воздействием аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу

Синтез наночастиц селена из диацетофенилселенида в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака

Так как нами была установлена возможность стабилизации наночастиц аминополисахаридами, нами был осуществлен синтез наночастиц в присутствии олигосахаридов, в частности на примере сахарозы. В качестве поставщика селена нами использовался диацетофенилселенида при температуре 25°C под воздействием аммиака было установлено, что образование наночастиц селена возможно. Во время синтеза не наблюдалось образование красного цвета (Рисунок 24-25), который мог бы свидетельствовать об образовании элементарного селена, а полнота прохождения реакции определялась методом ТСХ по исчезновению исходного соединения в растворе.

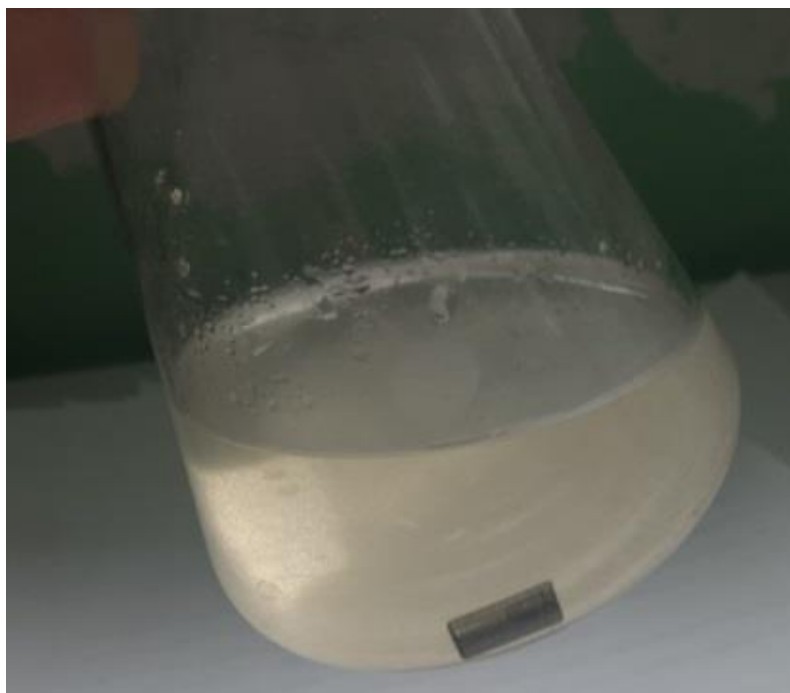


Рисунок 24 – Синтез по методике наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака №1. Результат на первые сутки

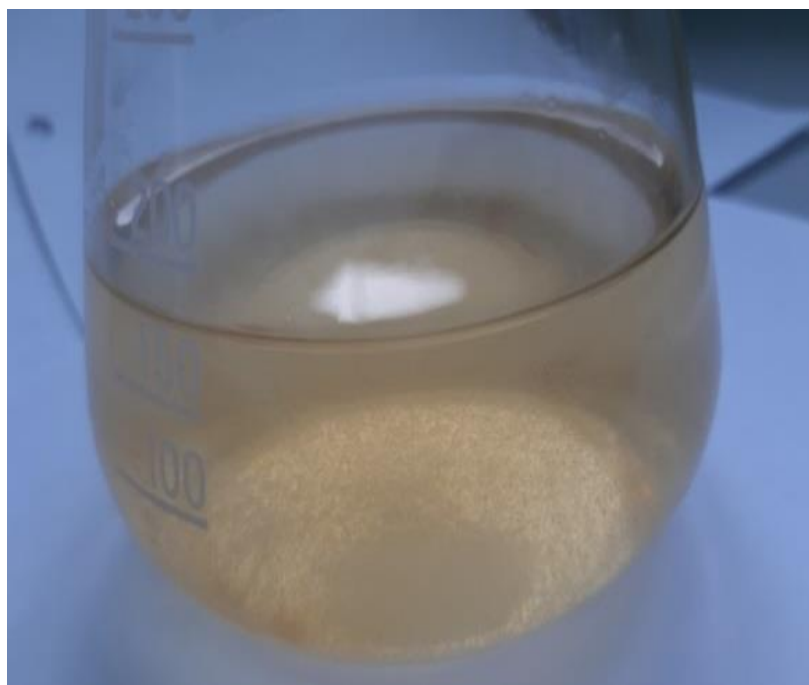


Рисунок 25 – Синтез наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака №2. Результат на первые сутки

На следующий день цвет меняется (Рисунок 26-27).



Рисунок 26 – Синтез наночастиц селена из дихлордифенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака №1. Результат на вторые сутки



Рисунок 27 – Синтез наночастиц селена из дихлордифенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака №2. Результат на вторые сутки

Полученные наночастицы в дальнейшем лиофильно высушивались, а размер определяли методом ДРС. Размер данных наночастиц составил от 37 нм до 220,2 нм (Рисунок 28), а средний размер 65,64.

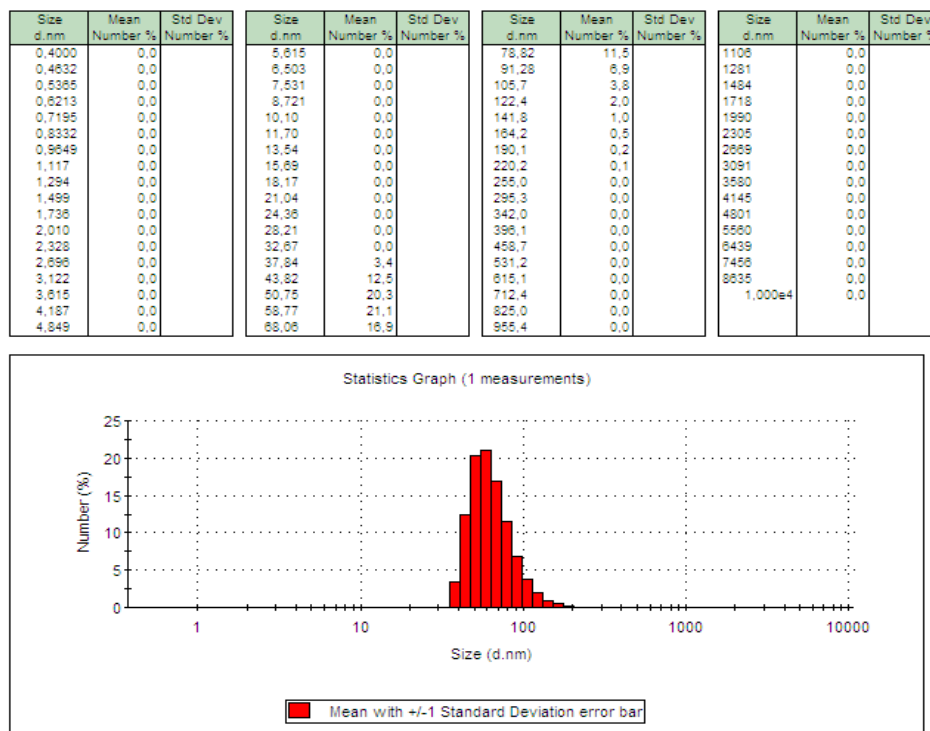


Рисунок 28 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу.

Для установления дальнейшей возможности использования данных наночастиц в фармацевтике нами были проведены исследования на возможность их стерилизации.

Существуют различные способы стерилизации наночастиц. Самые распространенные методы стерилизации — это суховоздушный стерилизатор и автоклавирование. Оба вида стерилизации направлены на создание среды с отсутствием микроорганизмов. Данные виды отличаются несколькими способами, включая механизм действия, время, необходимое для стерилизации, и типы материалов, которые можно стерилизовать. Автоклавирование имеет свое преимущество по сравнению с суховоздушным стерилизатором, а это именно

нагретый пар, образующийся вокруг наночастиц, даже при небольших температурах воды способен достаточно эффективно проводить процессы очистки. Температурный режим суховоздушного стерилизатора составляет во время работы 50-200°C, при стерилизации 160 - 200°C, а температурный режим при автоклавировании от 100 до 120 °C, чем плотнее структура продукта и чем больше объём тары, тем дольше должен проводиться нагрев.

Нами был выбран вариант стерилизации в автоклаве. Стерилизация в автоклаве инъеклируемых контрастных агентов считается одним из наиболее надежных и недорогих методов стерилизации. Наночастицы селена стабилизированные сахарозой были стерилизованы в автоклаве. При температуре 120 °C на протяжении 60 минут.

Стерилизацию наночастиц осуществляли в растворе воды, а не лиофильно высушенного порошка, для создания максимально тяжелых условий для дальнейшего практического применения. Установлено, что наночастицы выдержали автоклавирование (Рисунок 29-30).



Рисунок 29 – Синтез №1 наночастицы селена из дихлордифеноилселенида при температуре 25 °C в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака. Результат после автоклавирования



Рисунок 30 – Синтез №3 наночастицы селена из дихлордицетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде $C_{12}H_{22}O_{11}$ под воздействием аммиака. Результат после автоклавирования

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида в среде при температуре 25°C и 17°C TWEEN 80 под воздействием перекиси водорода

Для создания стабильных наночастиц так же 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. Так же 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 (Рисунок 31). Средний размер 69,72 нм.

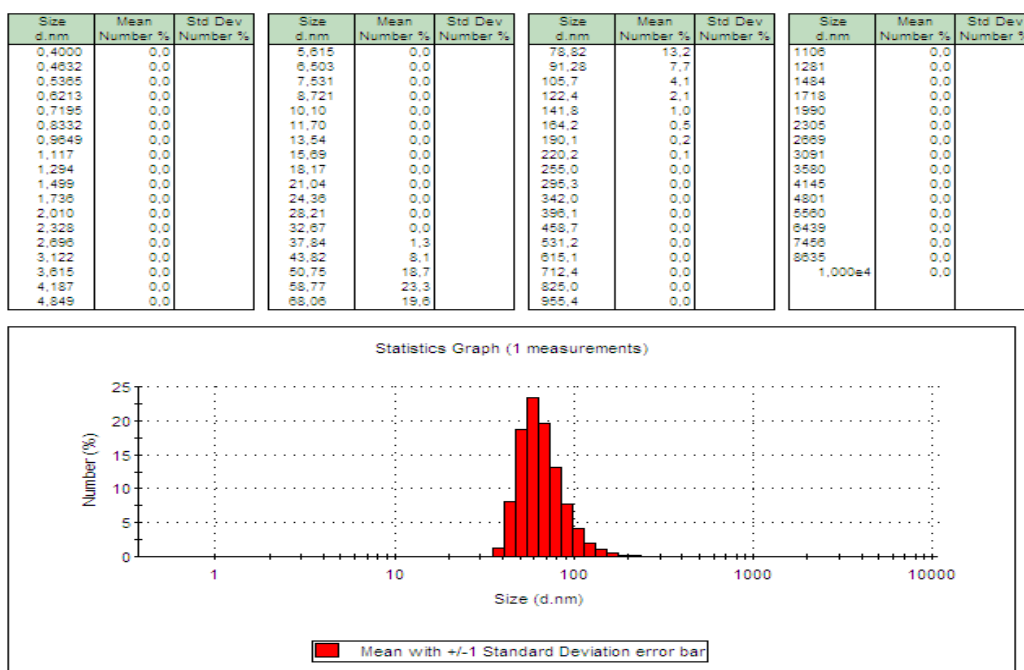


Рисунок 31 - Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде TWEEN 80 под воздействием перекиси водорода. Диаграмма распределения частиц по числу.

Аналогичная картина наблюдалась и при проведении синтеза при температуре 17°C (Рисунок 32).

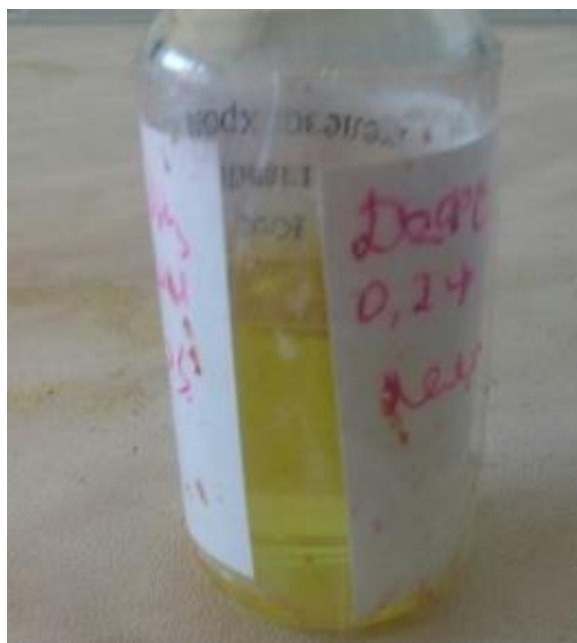


Рисунок 32 - Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 17°C в среде TWEEN 80 под воздействием перекиси водорода

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 нами 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 (Рисунок 33) со средним размером 70,84 нм.

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	15,1		1106	0,0	
0,4832	0,0		6,503	0,0		91,28	9,1		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	0,0		105,7	5,0		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	2,5		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	1,2		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,8		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,3		2659	0,0	
1,1117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,1		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		398,1	0,0		5580	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		459,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	0,0		531,2	0,0		7456	0,0	
3,122	0,0		43,82	4,8		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	16,3		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		59,77	23,6		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,06	21,4		955,4	0,0				

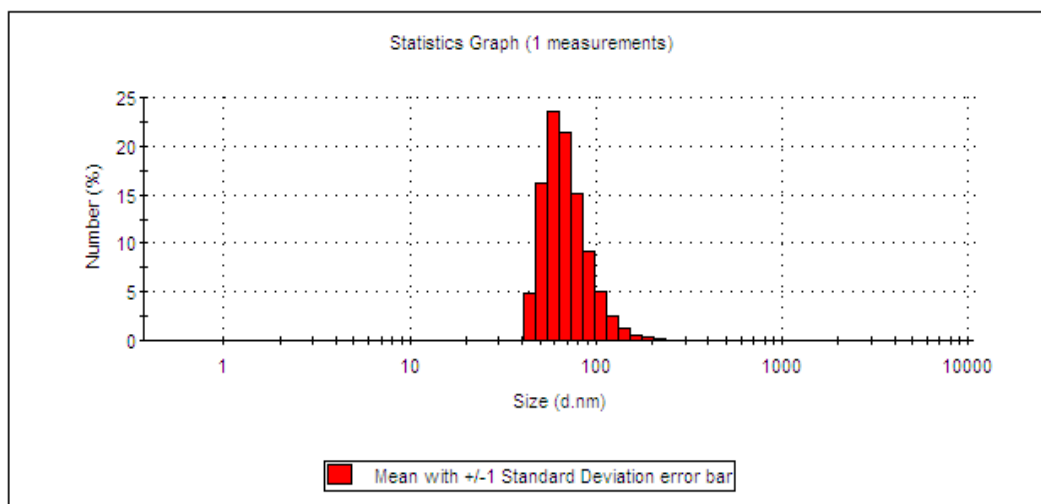


Рисунок 33 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 17 °С в среде TWEEN 80 под воздействием перекиси водорода. Диаграмма распределения частиц по числу

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида в среде TWEEN 80 при температуре 50 °С под воздействием аммиака

Так же для смягчения реакционных условий нами был проведен синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида в присутствии TWEEN 80 под воздействием аммиака, при 50 °С, однако при такой температуре происходит видимо слишком быстрое высвобождение селена, что приводит к образованию не стабильных наночастиц, а макро- и микрочастиц, что не позволяет получить стабильные их растворы и как следствие требует изменения условий проведения реакции. Так, например, в синтезе наночастиц селена из диацетофенонилселенида в концентрации 12,5 мг/мл при температуре 50 °С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака сразу же после перемешивания цвет изменялся на темно-коричневый и наблюдалось образование осадка темного цвета, свойственного кристаллическому селену (Рисунок 34).



Рисунок 34 - Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 50°С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака

Анализ ДРС показал размер от 91 нм до 955,4 нм. (Рисунок 35), а средний размер составил 233,29 нм.

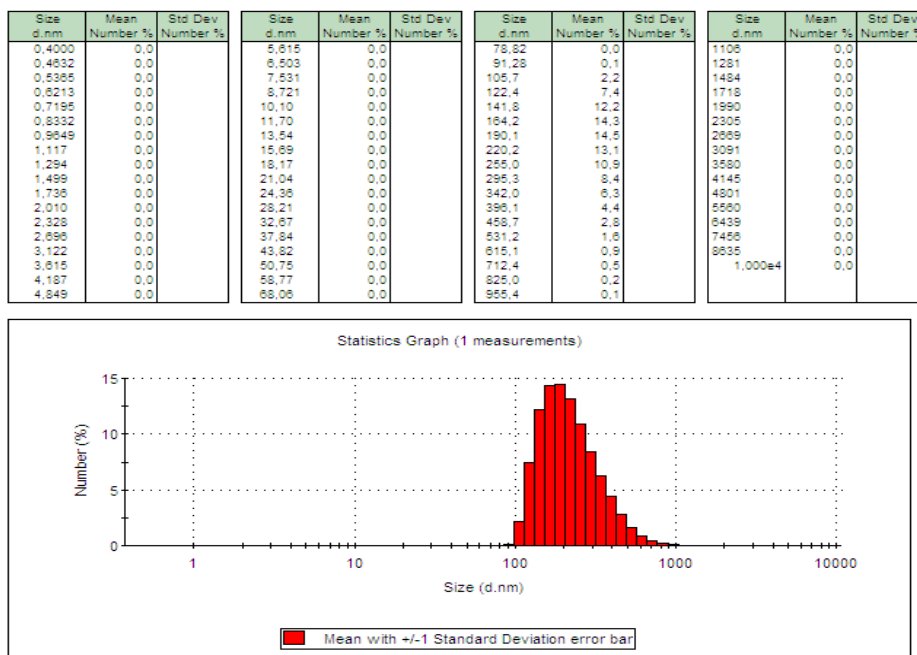


Рисунок 35 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 50 °С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу

Аналогичная картина наблюдалась и при концентрации 40 мг/мл диацетофенонилселенида. Цвет синтеза приобретал темно-коричневый оттенок. Образовался осадок черного цвета (Рисунок 36).



Рисунок 36 - Синтез наночастиц селена при повышенной концентрации диацетофенонилселенида при температуре 50°C в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака

Размер ДРС составлял от 105 нм до 1281 нм (Рисунок 37), средний размер 285,45 нм.

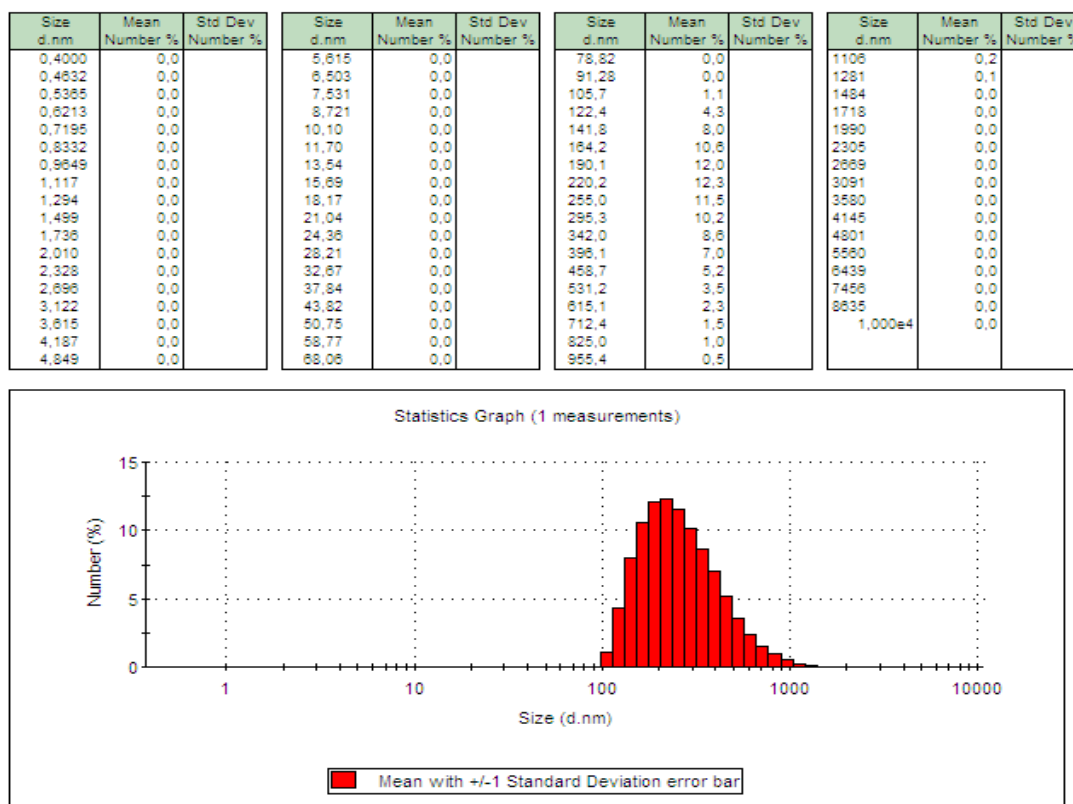


Рисунок 37 – Измерение наночастиц селена при повышенной концентрации диацетофенилселенида при температуре 50 °С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу

Синтез наночастиц селена из диацетофенилселенида в среде TWEEN 80 при температуре 25°С

Так как в описанных выше условиях было установлено образование микро и макрочастиц, нами был осуществлен аналогичный синтез при температуре 25°С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака, что позволило замедлить реакцию образования селена и как следствие получать частицы меньшего размера.

Так, например, синтез наночастиц селена с концентрацией 12,5 мг/мл диацетофенилселенида при температуре 25°С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака видимых изменений не наблюдалось, раствор имел цвет, соответствующий цвету TWEEN 80. Осадок не выпадал (Рисунок 38).

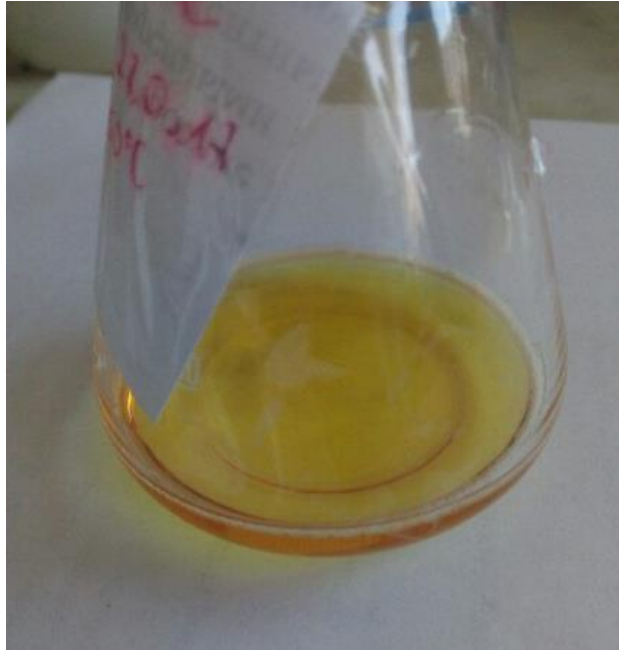


Рисунок 38 – Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака сразу после эксперимента

После перемешивания раствор поместили в темное сухое место при температуре 25 °С. Через 7 суток наблюдалось появление коричневого оттенка, что дает нам предположить наличие наноселена в растворе (Рисунок 39).



Рисунок 39 – Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака через 7 суток

Однако через 45 суток хранения вещества в сухом темном помещении при температуре 25 °С наблюдается выпадение небольшого количества черного осадка, свойственного кристаллическому селену. Цвет становился более насыщенно-коричневый (Рисунок 40).



Рисунок 40 – Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака через 45 суток

Результат ДРС от 50,75 до 295,3 (Рисунок 41). Средний размер 86,32 нм.

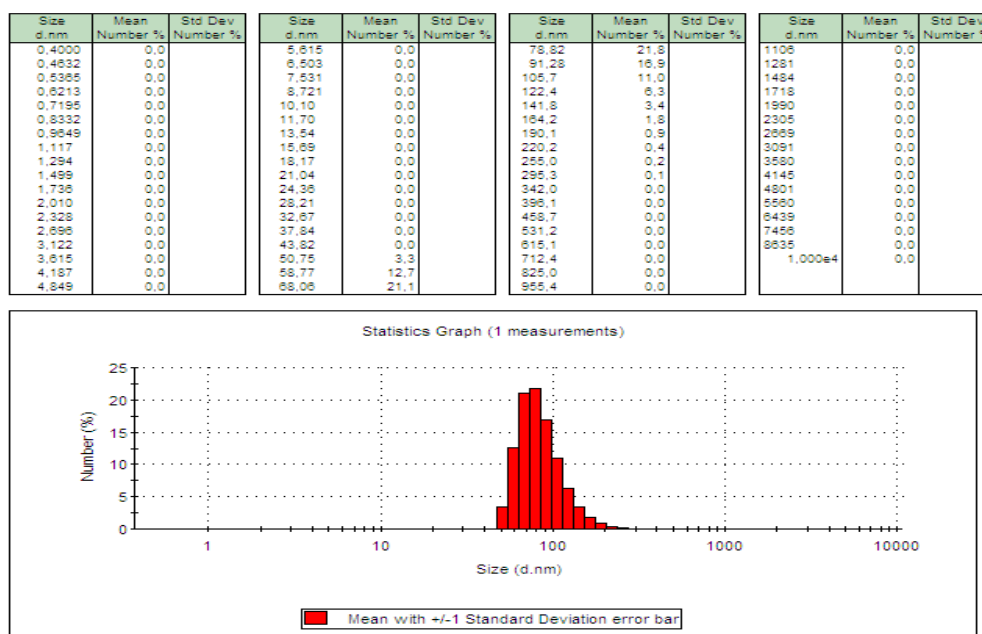


Рисунок 41 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу.

Также, в синтезе наночастиц селена при повышенной концентрации диацетофенонилселенида 40 мг/мл при температуре 25 °С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака наблюдалось появление изменения цвета через 7 суток. Из-за повышенного содержания диацетофенонилселенида осадок выпадал спустя 30 суток после проведения эксперимента при хранении вещества в темном сухом месте при температуре 25 °С (Рисунок 42).

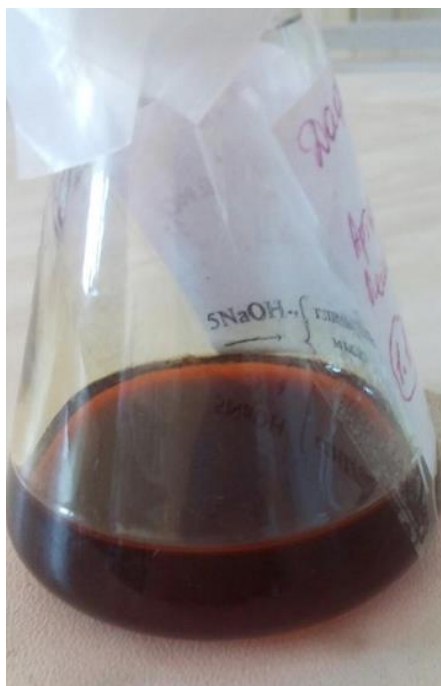


Рисунок 42 – Синтез наночастиц селена при повышенной концентрации диацетофенонилселенида при температуре 25°С в среде TWEEN 80 под воздействием аммиака через 30 суток

Таким образом установлено, что использование аммиака для выделения селена из селеноорганического соединения при стабилизации полученных наночастиц TWEEN-80 позволяет получать стабильные наночастицы, а образование нестабильных коллоидных систем, выпадающих в осадок, происходит более чем на 30 сутки.

Установлено, что размер наночастиц по результатам ДРС проведенным на 7 сутки эксперимента составляет 43 нм до 615,1 нм (Рисунок 43). Средний размер 104,59 нм.

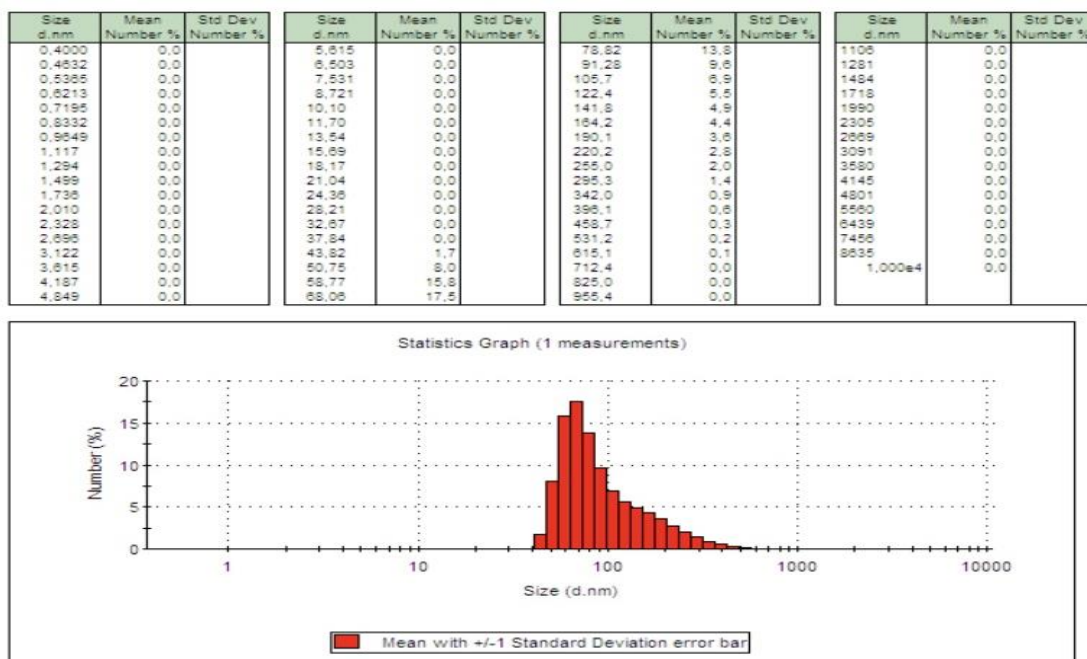


Рисунок 43 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде TWEEN 80 под воздействием высокой концентрации аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу

Синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида стабилизированных Кремофор А-25

Ранее нами было установлено образование наночастиц селена в присутствии TWEEN-80 из диацетофенонилселенида, однако данный метод синтез наночастиц имеет 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 невозможно, 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 лиофилировать получаемые наночастицы и хранить их в твердой форме. Для получения селена из диацетофенонилселенида нами был на первом этапе 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 свет и средний размер составил 177,5 нм, а интервал размера наночастиц находился в интервале от 91 нм до 531,2 нм (Рисунок 44).

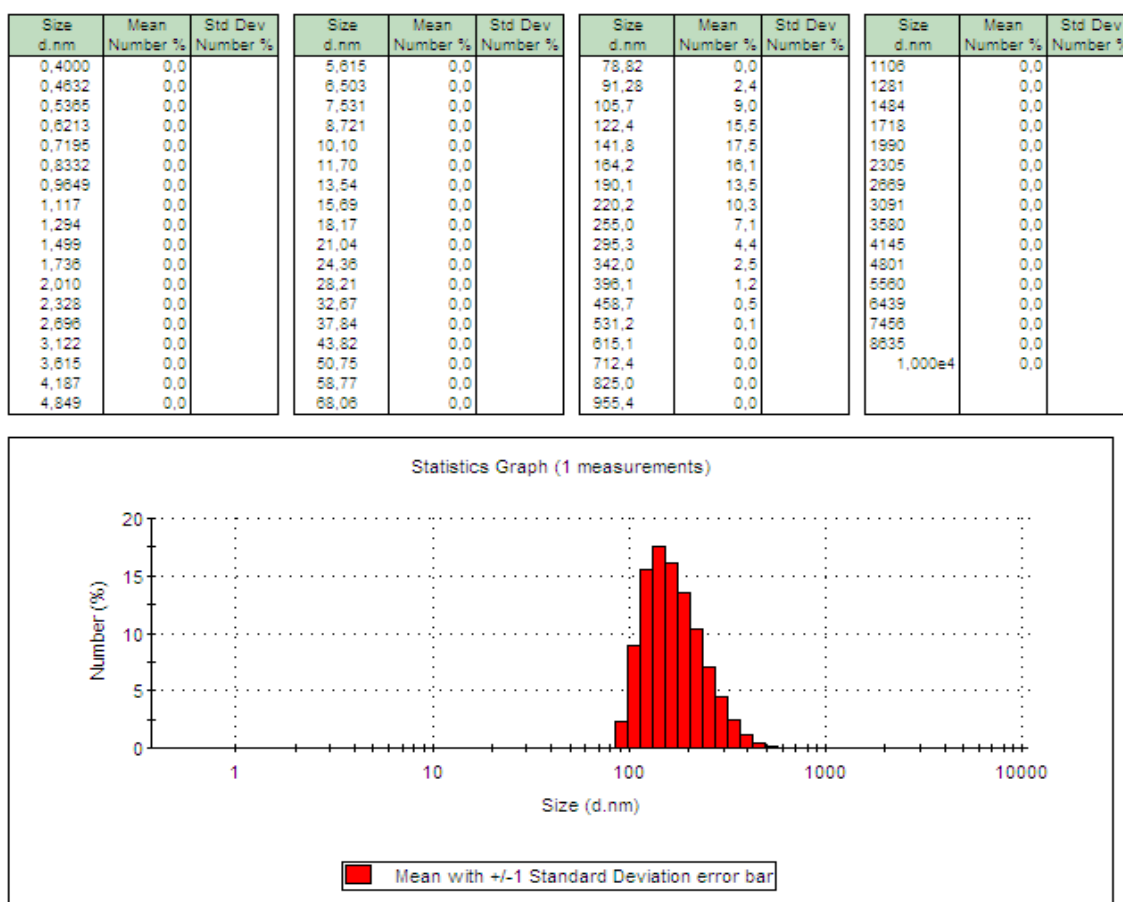


Рисунок 44 – измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде Кремофора А-25 под воздействием аммиака. Диаграмма распределения частиц по числу

Так как полученные результаты имели широкий интервал, а для исследования на биологическую активность необходимо использование одинаковых по размеру наночастиц, 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 (Рисунок 45), со средним размером 58,83.

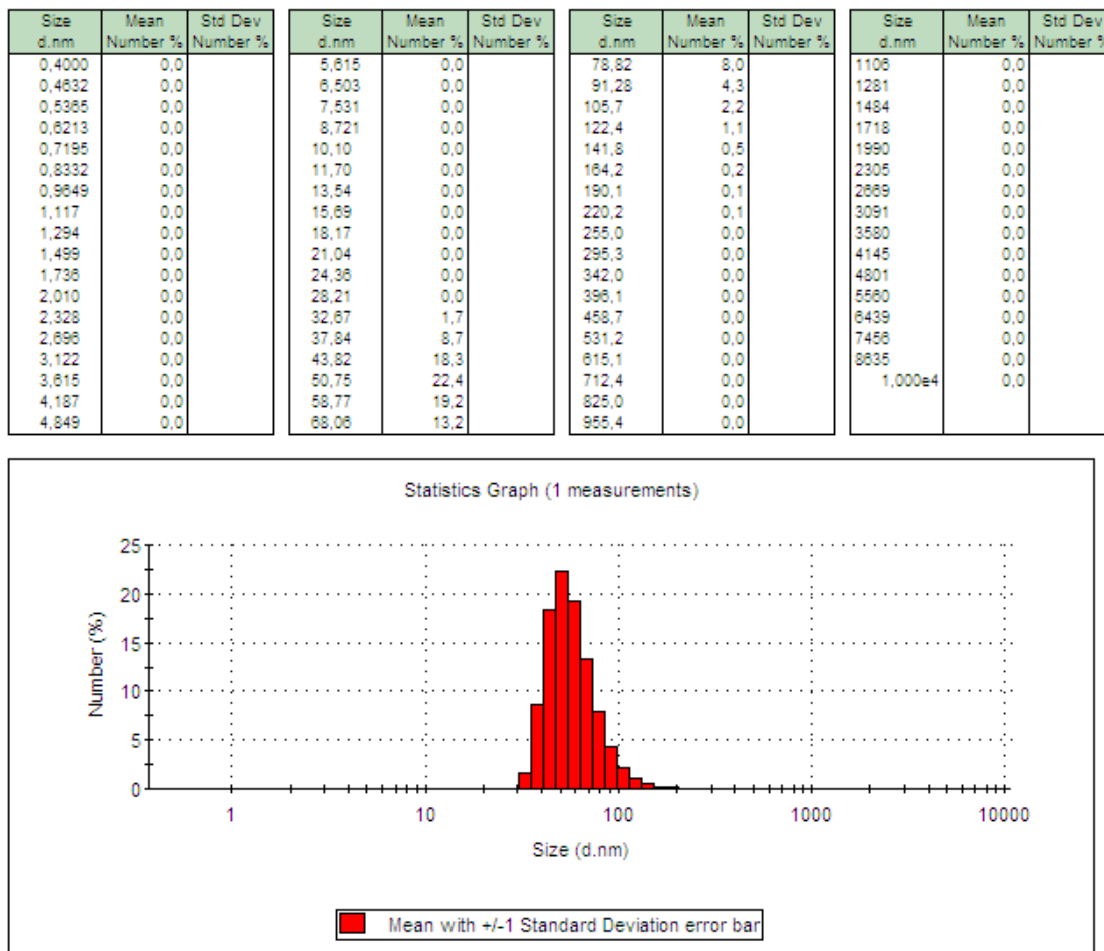


Рисунок 45 – измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде Кремофора А-25 под воздействием сульфата аммония. Диаграмма распределения частиц по числу.

Так же 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 (Рисунок 46).

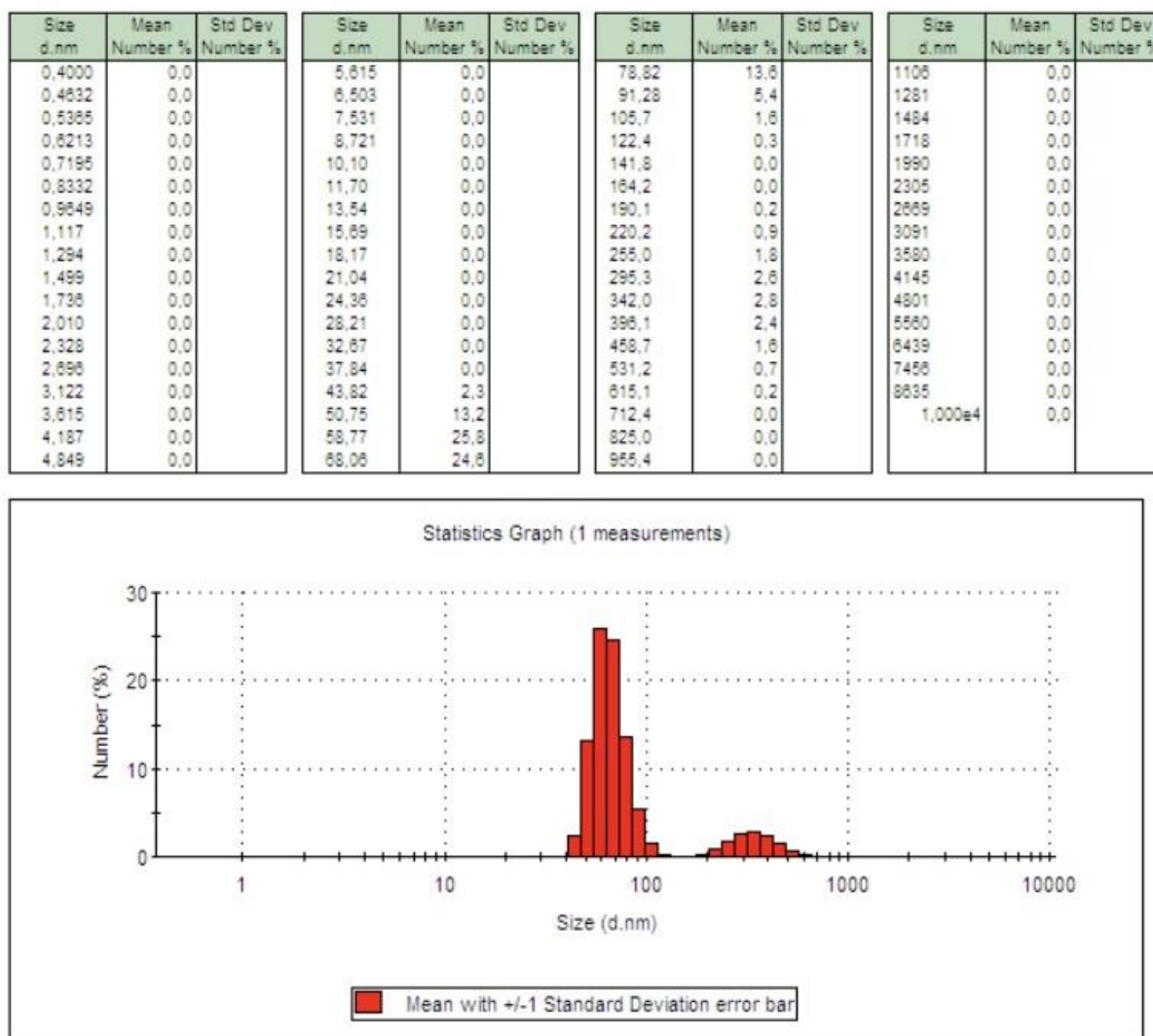


Рисунок 46 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25 °С в среде Кремофора А-25 под воздействием аскорбиновой кислоты. Диаграмма распределения частиц по числу.

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 (Рисунок 47), 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.

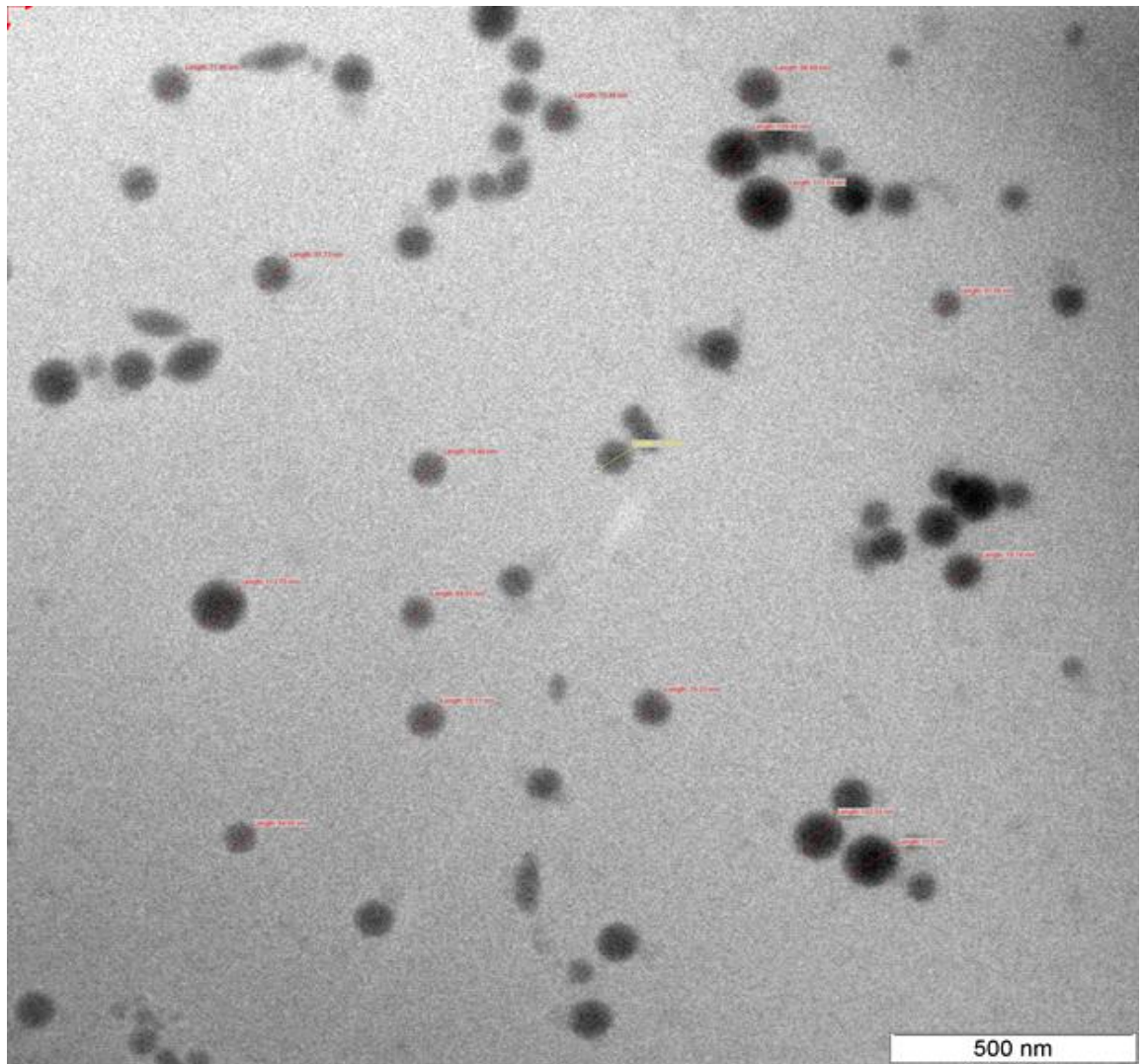


Рисунок 47 – Наночастицы селена под электронным микроскопом размером 50-150 нм.

Так же нами 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 нм до 295,3 нм (Рисунок 48). Что говорит о большей однородности полученных наночастиц относительно аскорбиновой кислоты и аммиака.

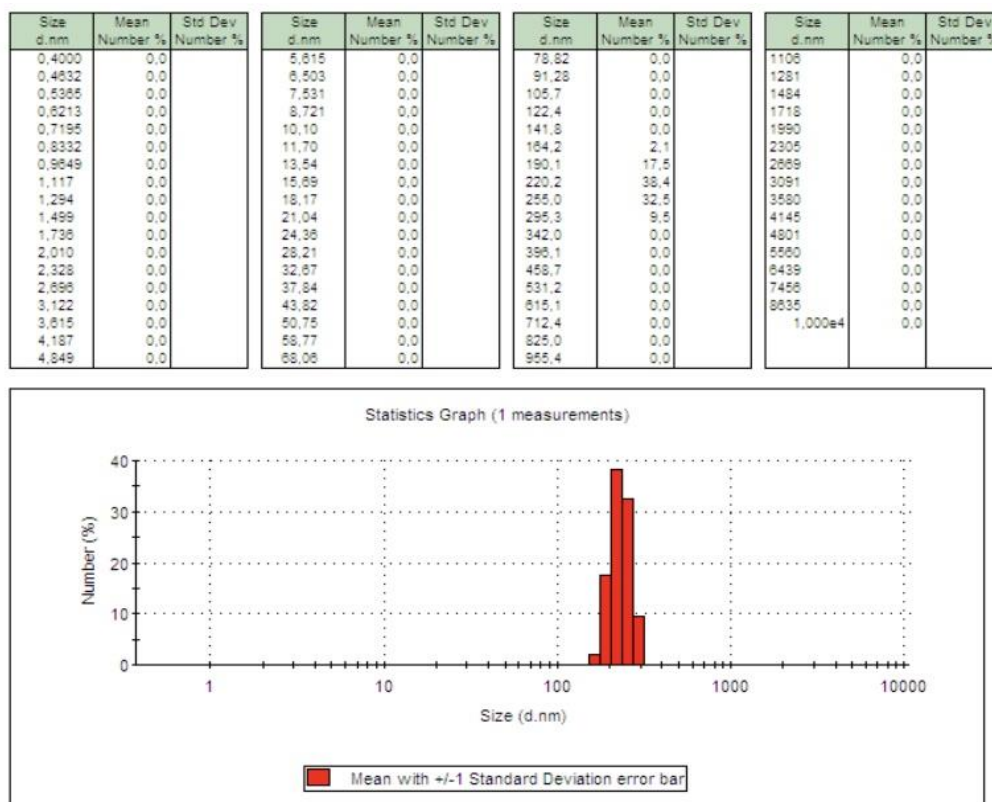


Рисунок 48 – Измерение наночастиц селена из диацетофенонилселенида при температуре 25°C в среде Кремофора А-25 под воздействием метионина. Диаграмма распределения частиц по числу

2.2.4. Исследование острой токсичности наночастиц селена

Прежде чем исследовать биологическую активность полученных наночастиц селена было необходимо определить LD_{50} , что в дальнейшем бы позволило бы оценить целесообразность их применения в повседневной практике. Испытание проводили на здоровых белых лабораторных мышах массой 19-21 г. За сутки до испытания и во время его проведения животные должны находиться в помещении с постоянной температурой. Каждую серию наночастиц селена испытывают на 3 мышах.

На первом этапе исследования готовили раствор №1, взвесив 0,175 г наноселена в 10 мл дистиллированной воды. Полученный концентрированный раствор вносили первой группе из 3 мышей в брюшную полость по 500 мкл на каждое животное. По истечении 10 минут появлялись первые признаки

интоксикации животного: у мышей наблюдалось нарушение функций организма, снижение сил сокращения мышц (гиподинамия), сосуды ушных раковин переполнялись кровью, выраженное покраснение кожи (гиперемия), мышцы слабо реагировали на внешние раздражители, замедленное дыхание. Наблюдение за животными вели в течении 48 ч. Наночастицы считали выдержавшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одна из подопытных мышей. В нашем случае все животные погибли.

На втором этапе исследований готовили раствор №2, который содержал 1 мл из раствора № 1, где взвесь 0,175 г наночастиц селена вносили в пенициллиновый флакон и разбавляли 10 мл дистиллированной водой, разбавляли 9 мл дистиллированной водой и вносили второй группе из 3 мышей в брюшную полость по 500 мкл на каждое животное. Проводили наблюдение в течении 48 ч и замечали, что все животные остаются живы.

Третьим этапом являлось введение раствора №3 – в котором в 10 раз разбавляли раствор №2 и вносили в брюшную полость по 500 мкл на каждое животное. Проводили наблюдение в течении 48 ч и замечали, что все 3 мыши остаются живы.

Анализируя вышеприведенные результаты, мы делаем вывод, что самым токсичным раствором является раствор №1. Исходя из этого мы готовили новый раствор №4 – брали 2 мл готового токсичного раствора №1 и разбавляли 2 мл дистиллированной водой. Также вводили по 500 мкл в брюшную полость на каждую мышь. По истечении времени замечали, что вся группа из 3 мышей не выжили.

Далее готовили раствор № 5 – это 2 мл раствора №1 вносим в 2 мл дистиллированной воды. Также вводили по 500 мкл в брюшную полость на каждую мышь. По истечении времени замечали, что вся группа из 3 мышей не выжили.

Раствор №6 – брали 1 мл из готового раствора № 1 и разбавляем 3 мл дистиллированной воды. Отмечено, что одна мышь из трех оставалась жива.

Раствор № 7 – 1 мл раствора №1 разбавляем 4 мл дистиллированной воды. Отмечаем, что жива оставалась вся группа из 3 мышей.

Раствор №8 – 1 мл раствора №1 разбавляем 3,5 дистиллированной воды. По истечении времени замечаем, что 2 мыши из 3 оставались живы.

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 (Рисунок 49).

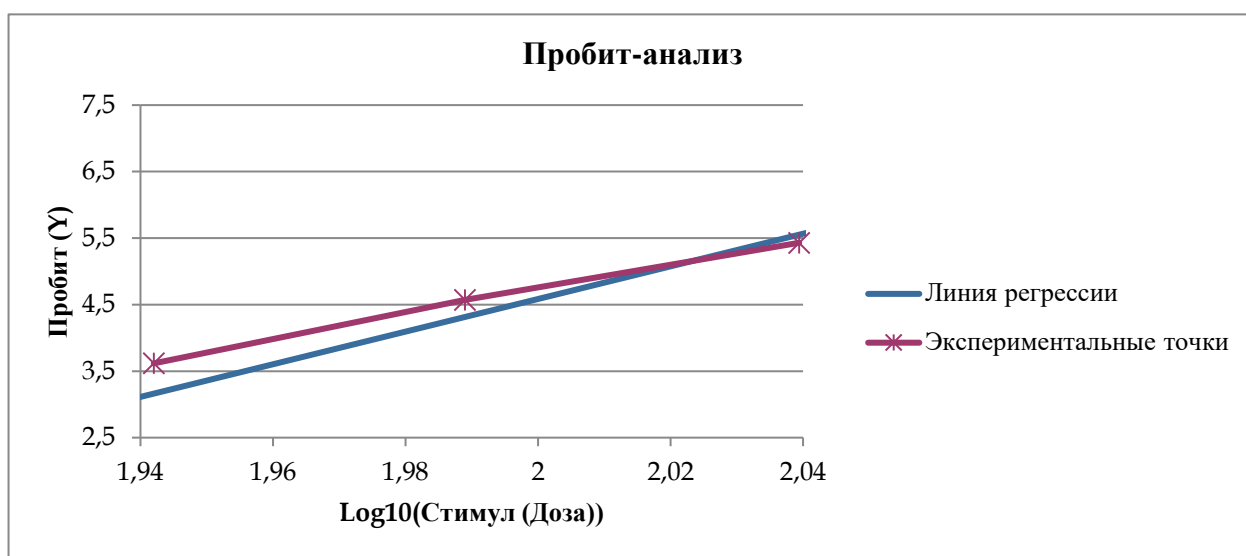


Рисунок 49 – Пробит анализ наночастиц селена

2.2.5. Местнораздражающее действие наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинипирролидоном

Обследование животных проводили следующим образом. Осматривали поверхность участков, где проводили провокационную пробу подопытных и контрольных животных, через 24; 48 ч после снятия повязки. Для визуализации реакций кожи рекомендуется использование естественного или освещения с полным спектром. Описывали и оценивали степень кожной реакции, включая эритему и отек для каждого участка.

Результаты проведенных исследований учитывали следующим образом. Если оценка в баллах, полученная в подопытной группе, равна 1 или выше, о наличии сенсibilизации говорят в том случае, если у контрольных животных этот показатель менее 1 балла. Если оценка в баллах у контрольных животных равна 1

или выше, то реакция кожи подопытных животных, которая превышает самую сильную реакцию, наблюдаемую в контроле, является результатом сенсibilизации. Если реакция сомнительная, проводят дополнительную провокационную пробу. Результат испытания может быть представлен как частота положительных результатов провокационной пробы в опытной и контрольной группах. Иногда в подопытной группе у большего, чем в контроле, числа животных выявлена ответная реакция, однако интенсивность реакции не выше, чем у контрольных животных. В этом случае проводят дополнительную провокационную пробу для получения более четкого ответа организма. При необходимости дополнительную провокационную пробу проводят в срок от 1 до 2 недель после первой провокации. При этом применяют описанный выше метод, используя другой бок животного. Рекомендуется использовать новую контрольную группу с введением адьюванта.

Анализируя полученные результаты были сделаны следующие выводы, что участок С имеет умеренную эритему и припухлость (Рисунок 50).

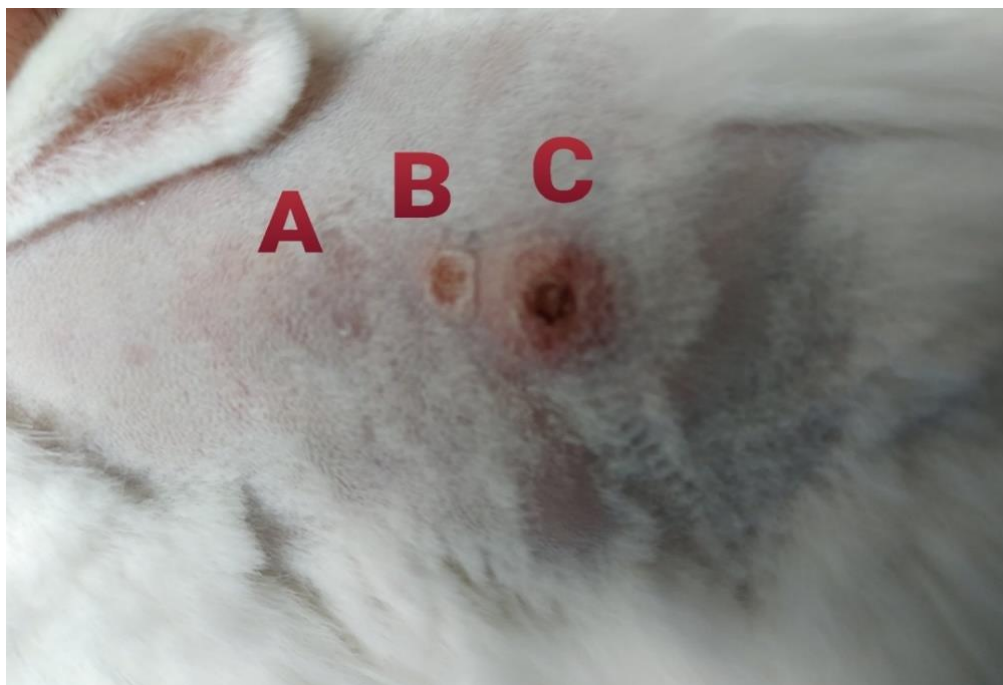


Рисунок 50 – Результаты исследования наночастиц селена при местно-раздражающем действии

2.2.6. Онкопротективные свойства селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинипирролидоном

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, в частности гиперэкспрессией фермента α -глицерофосфатдегидрогеназы и субъединицы ГАМК-канала, клеточным полиморфизмом, высокой генетической гетерогенностью, что делает GBM устойчивым к терапии.

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.

Исследования выполнялись согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010 г.). Эксперименты на животных проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите

позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Исследования осуществлялись согласно утверждённому письменному протоколу и в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

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, внутривенно, однократно вводили раствор наночастиц селена (концентрация 0,75 мг/мл) в дозе 3 мг/кг массы тела.

За время исследования мыши не проявляли видимой реакции на вводимые им препараты. В течение 13 дней изменений не наблюдалось.

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 чёткие (Рисунок 51).



Рисунок 51 – Новообразования у группы №1. День 15

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. (Рисунок 52).

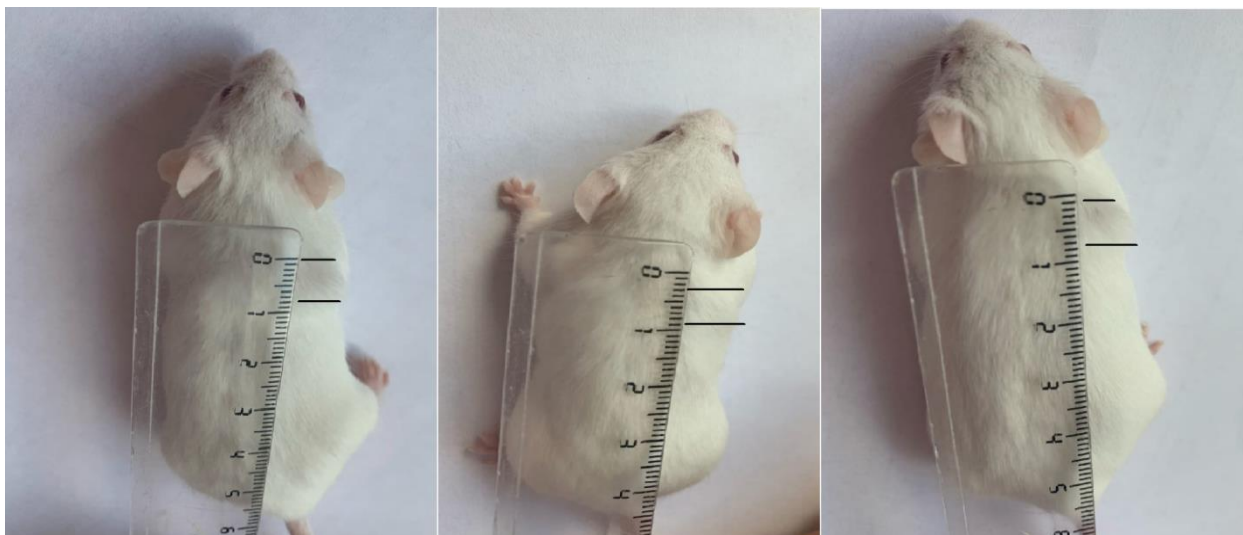


Рисунок 52 – Новообразования у группы №2. День 15

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 отчётливо выделялись на фоне остальных групп разнородной формой (Рисунок 53).



Рисунок 53 – Новообразования у группы №3 и №4. День 15

На 17 день исследования образования прогрессировали пропорционально, равномерно (Приложение 2, Рисунок 54-55).

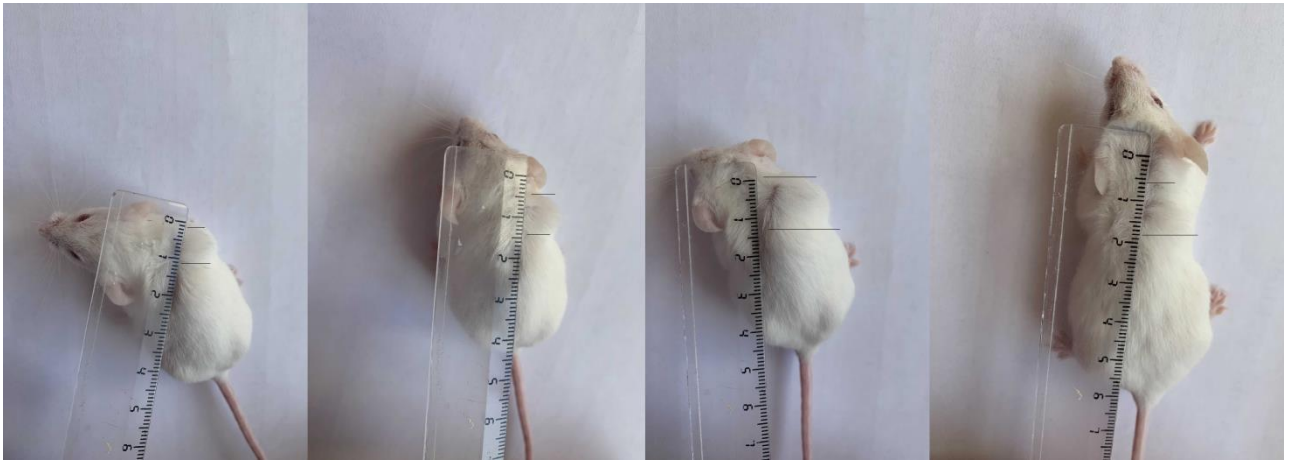


Рисунок 54 – Новообразования у группы №1. День 17



Рисунок 55 – Новообразования у группы №2. День 17

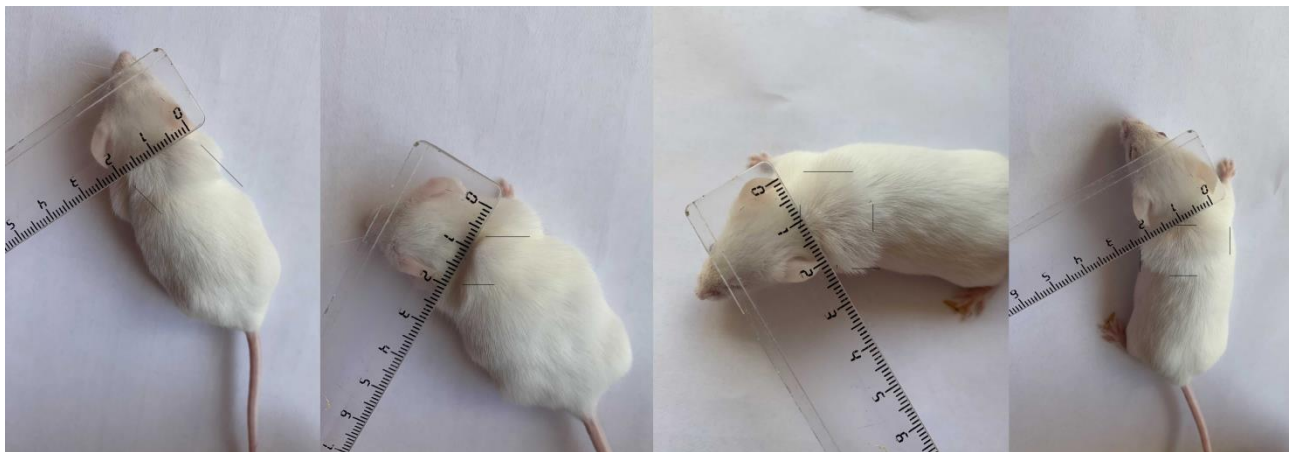


Рисунок 56 – Новообразования у группы №3. День 17

Также у одной мыши из группы №4 появилось новообразование (Рисунок 57).



Рисунок 57 – Новообразования у группы №4. День 17

К концу эксперимента необходимо было оценить изменения крови и внутренних органов животных. Кровь у мышей отбирали постмортально. Эвтаназию проводили с применением средств для наркоза Isoflurane, USP. После вскрытия видимые опухоли просматривались только у группы №1, №3 и №4 (Рисунок 58-61).



Рисунок 58 – Вскрытие группы №1

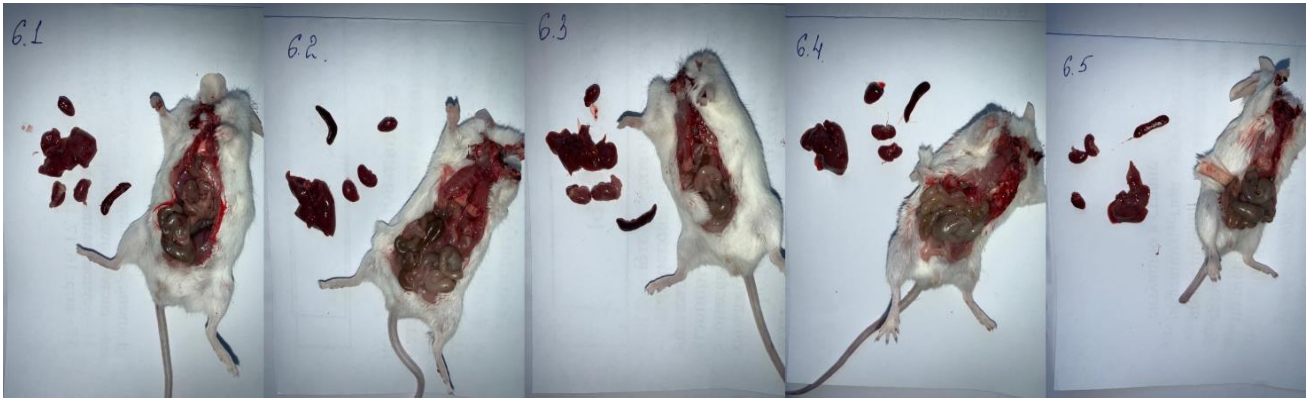


Рисунок 59 – Вскрытие группы №2



Рисунок 60 – Вскрытие группы №3



Рисунок 61 – Вскрытие группы №4

Для гематологических исследований отбирали в пробирки с антикоагулянтом EDTA К3, для биохимических исследований в пробирки с активатором свертывания. После вскрытия мышей отбирали внутренние органы

(сердце, печень, почки, селезенка) для определения их массовых коэффициентов (Таблицы 4-18).

Таблица 4 – Масса и коэффициент массы органов лабораторных животных в эксперименте на онкопротекторные свойства

Масса и коэффициент массы органов лабораторных животных				
№	Группа №1	Группа №2	Группа №3	Группа №4
Масса мыши	25,07+/-9,92	28,78+/-2,95	26,87+/-1,86	27,77+/-2,82
Масса сердца	0,103+/-0,03	0,128+/-0,03	0,113+/-0,03	0,113+/-0,03
Коэффициент массы сердца, %	0,427+/-0,08	0,445+/-0,09	0,421+/-0,08	0,406+/-0,05
Масса печени	1,44+/-0,51	1,28+/-0,16	1,38+/-0,05	1,3+/-0,2
% печени	5,8+/-0,46	4,45+/-0,35	5,15+/-0,52	4,66+/-0,34
масса почек	0,307+/-0,11	0,328+/-0,1	0,347+/-0,04	0,347+/-0,12
% почек	1,241+/-0,11	1,13+/-0,29	1,295+/-0,19	1,233+/-0,3
масса селезенки	0,217+/-0,12	0,106+/-0,05	0,187+/-0,08	0,11+/-0,02
% селезенки	1,05+/-0,88	0,367+/-0,15	0,7+/-0,31	0,4+/-0,06

Таблица 5 – Масса и процент органов группы №1

№	1	2	3	
Масса мыши	32,9	15,6	26,7	25,07+/-9,92
Масса сердца	0,13	0,08	0,1	0,103+/-0,03
Коэффициент массы сердца, %	0,40	0,51	0,37	0,427±0,08
Масса печени	1,76	0,92	1,64	1,44+/-0,51
% печени	5,35	5,90	6,14	5,8+/-0,46
Масса почек	0,4	0,21	0,31	0,307+/-0,11
% почек	1,22	1,35	1,16	1,241+/-0,11
Масса селезенки	0,1	0,29	0,26	0,217+/-0,12
% селезенки	0,30	1,86	0,97	1,05+/-0,88

Таблица 6 – Коэффициент массы органов мышей группы №2

№	1	2	3	4	5	
Масса мыши	31,4	29,5	29,7	30,4	22,9	28,78+/-2,95
Масса сердца	0,1	0,13	0,13	0,18	0,1	0,128+/-0,03
% сердца	0,32	0,44	0,44	0,59	0,44	0,445+/-0,09
Масса печени	1,23	1,48	1,32	1,38	0,99	1,28+/-0,16
% печени	3,92	5,02	4,44	4,54	4,32	4,45+/-0,35

Масса почек	0,29	0,3	0,5	0,35	0,2	0,328+/-0,1
% почек	0,92	1,02	1,68	1,15	0,87	1,13+/-0,29
Масса селезенки	0,07	0,09	0,2	0,1	0,07	0,106+/-0,05
% селезенки	0,22	0,31	0,67	0,33	0,31	0,367+/-0,15

Таблица 7 – Масса и процент органов группы №3

№	1	2	3	
Масса мышцы	27,5	25	28,1	26,87+/-1,86
Масса сердца	0,1	0,1	0,14	0,113+/-0,03
% сердца	0,36	0,40	0,50	0,421+/-0,08
Масса печени	1,4	1,41	1,33	1,38+/-0,05
% печени	5,09	5,64	4,73	5,15+/-0,52
Масса почек	0,38	0,35	0,31	0,347+/-0,04
% почек	1,38	1,40	1,10	1,295+/-0,19
Масса селезенки	0,25	0,2	0,11	0,187+/-0,08
% селезенки	0,91	0,80	0,39	0,7+/-0,31
Масса опухоли	0,52	-	0,79	
% опухоли	1,89	-	2,81	

Таблица 8 – Масса и процент органов группы №4

№	1	2	3	
Масса мышцы	30,6	26,8	25,9	27,77+/-2,82
Масса сердца	0,14	0,1	0,1	0,113+/-0,03
% сердца	0,46	0,37	0,39	0,406+/-0,05
Масса печени	1,5	1,16	1,23	1,3+/-0,2
% печени	4,90	4,33	4,75	4,66+/-0,34
Масса почек	0,47	0,29	0,28	0,347+/-0,12
% почек	1,54	1,08	1,08	1,233+/-0,3
Масса селезенки	0,13	0,09	0,11	0,11+/-0,02
% селезенки	0,42	0,34	0,42	0,4+/-0,06
Масса опухоли	-	0,02	0,04	
% опухоли	-	0,07	0,15	

Таблица 9 – Общий анализ крови лабораторных животных в эксперименте на онкопротекторные свойства.

Общий анализ крови лабораторных животных				
Показатель	Группа №1	Группа №2	Группа №3	Группа №4
WBC, $\times 10^9/L$	4,37 \pm 3,53	1,02 \pm 0,35	2,17 \pm 0,8	11,9 \pm 9,73
LYM, $\times 10^9/L$	2,37 \pm 1,46	0,78 \pm 0,29	1,23 \pm 0,46	11,63 \pm 9,45
MID, $\times 10^9/L$	1,6 \pm 1,58	0,2 \pm 0,11	0,57 \pm 0,17	0,23 \pm 0,24
GRA, $\times 10^9/L$	0,37 \pm 0,52	0,04 \pm 0,05	0,1 \pm 0,01	0,03 \pm 0,06
LYM%	0,58 \pm 0,1	0,75 \pm 0,1	0,66 \pm 0,05	0,98 \pm 0,01
MID%	0,34 \pm 0,06	0,17 \pm 0,07	0,28 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01
GRA%	0,08 \pm 0,04	0,09 \pm 0,05	0,06 \pm 0,01	0 \pm 0
RBC, $\times 10^{12}/L$	7,72 \pm 2,27	5,62 \pm 0,93	5,18 \pm 0,74	4,97 \pm 0,86
HGB, g/L	120 \pm 32,74	87,2 \pm 14,51	87 \pm 7,92	75 \pm 15,9
MCHC, g/L	369 \pm 25,74	385,2 \pm 20,38	378 \pm 4,28	383 \pm 10,45
MCH, pg	15,7 \pm 0,88	15,52 \pm 0,63	16,1 \pm 0,97	15,1 \pm 0,69
MCV, fL	42,53 \pm 1,01	40,36 \pm 1,23	43,5 \pm 2,75	39,5 \pm 1,42
RDW-CV, %	0,15 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
RDW-SD, fL	31,77 \pm 2,73	35,44 \pm 2,7	32 \pm 4,02	27,43 \pm 0,94
HCT, %	0,33 \pm 0,1	0,23 \pm 0,04	0,23 \pm 0,02	0,2 \pm 0,04
PLT, $\times 10^9/L$	403,67 \pm 86,84	580 \pm 344,92	308,33 \pm 70,78	378 \pm 88,23
MPV, fL	6,3 \pm 1,13	7 \pm 2,89	5,83 \pm 0,35	5,2 \pm 0,2
PDW, fL	6,5 \pm 3,53	4,14 \pm 0,52	4,03 \pm 0,24	4 \pm 0,49
PCT, %	0,0025 \pm 0	0,01 \pm 0,01	0,0017 \pm 0	0,002 \pm 0
P-LCR, %	0,112 \pm 0,11	0,14 \pm 0,21	0,047 \pm 0,03	0,008 \pm 0,01

Таблица 10 – Общий анализ крови группы №1

Показатель	№			
	1	2	3	
WBC, $\times 10^9/L$	2	7,9	3,2	4,37 \pm 3,53
LYM, $\times 10^9/L$	1,3	3,8	2	2,37 \pm 1,46
MID, $\times 10^9/L$	0,6	3,2	1	1,6 \pm 1,58
GRA, $\times 10^9/L$	0,1	0,9	0,1	0,37 \pm 0,52
LYM%	64%	48%	61%	0,58 \pm 0,1
MID%	30,60%	39,90%	32,30%	0,34 \pm 0,06

GRA%	5,40%	12,10%	6,60%	0,08+/-0,04
RBC, x10 ¹² /L	8,93	8,82	5,4	7,72+/-2,27
HGB, g/L	132	141	87	120+/-32,74
MCHC, g/L	344	376	388	369+/-25,74
MCH, pg	14,8	16,2	16,1	15,7+/-0,88
MCV, fL	43	43,1	41,5	42,53+/-1,01
RDW-CV, %	13,50%	15,50%	15,80%	0,15+/-0,01
RDW-SD, fL	29	33,4	32,9	31,77+/-2,73
HCT, %	38,40%	38,00%	22,40%	0,33+/-0,1
PLT, x10 ⁹ /L	491	347	373	403,67+/-86,84
MPV, fL	6,3	7,3	5,3	6,3+/-1,13
PDW, fL	5,5	10	4	6,5+/-3,53
PCT, %	0,307%	0,252%	0,197%	0,0025+/-0
P-LCR, %	10,80%	20,80%	2,00%	0,112+/-0,11

Таблица 11 – Общий анализ крови группы №2

Показатель	1	2	3	4	5	
WBC, x10 ⁹ /L	1,3	0,5	1	1,5	0,8	1,02+/-0,35
LYM, x10 ⁹ /L	1,1	0,3	0,9	1	0,6	0,78+/-0,29
MID, x10 ⁹ /L	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2+/-0,11
GRA, x10 ⁹ /L	0	0,1	0,002	0,1	0	0,04+/-0,05
LYM%	77,2%	62,8%	91,8%	69,4%	72,3%	0,75+/-0,1
MID%	11,8%	21,7%	6,3%	25,2%	18,8%	0,17+/-0,07
GRA%	11%	15,5%	1,9%	5,4%	8,9%	0,09+/-0,05
RBC, x10 ¹² /L	5,48	6,61	5,26	6,64	4,1	5,62+/-0,93
HGB, g/L	89	107	79	97	64	87,2+/-14,51
MCHC, g/L	400	407	392	348	379	385,2+/-20,38
MCH, pg	16,2	16,2	15	14,6	15,6	15,52+/-0,63
MCV, fL	40,6	39,8	38,3	42	41,1	40,36+/-1,23
RDW-CV, %	16,7%	19,1%	20,4%	16,3%	15,50%	0,18+/-0,02
RDW-SD, fL	33,8	38,1	39,2	34,2	31,9	35,44+/-2,7
HCT, %	22,2%	26,3%	20,2%	27,9%	16,90%	0,23+/-0,04
PLT, x10 ⁹ /L	413	516	1265	440	266	580+/-344,92
MPV, fL	5,8	5,4	12,9	5,5	5,4	7+/-2,89
PDW, fL	4,7	4,8	3,9	3,4	3,9	4,14+/-0,52
PCT, %	0,238%	0,28%	1,627%	0,243%	0,143%	0,01+/-0,01
P-LCR, %	6%	2,3%	56,3%	5,1%	1,50%	0,14+/-0,21

Таблица 12 – Общий анализ крови группы №3

Показатель	1	2	3	
WBC, x10 ⁹ /L	2,8	2,3	1,4	2,17+/-0,8
LYM, x10 ⁹ /L	1,3	1,6	0,8	1,23+/-0,46
MID, x10 ⁹ /L	0,6	0,7	0,4	0,57+/-0,17
GRA, x10 ⁹ /L	0,092	0,1	0,12	0,1+/-0,01
LYM%	61%	67,1%	69,4%	0,66+/-0,05
MID%	32,3%	27,2%	25,2%	0,28+/-0,04
GRA%	6,6%	5,5%	5,4%	0,06+/-0,01
RBC, x10 ¹² /L	5,4	5,7	4,45	5,18+/-0,74
HGB, g/L	92	90	79	87+/-7,92
MCHC, g/L	381	380	374	378+/-4,28
MCH, pg	16,2	15,2	16,9	16,1+/-0,97
MCV, fL	40,8	44,2	45,5	43,5+/-2,75
RDW-CV, %	15,4%	13,6%	15,6%	0,15+/-0,01
RDW-SD, fL	34,2	27,9	33,9	32+/-4,02
HCT, %	25,50%	23,50%	21,10%	0,23+/-0,02
PLT, x10 ⁹ /L	378	290	257	308,33+/-70,78
MPV, fL	6,1	5,9	5,5	5,83+/-0,35
PDW, fL	4,1	3,8	4,2	4,03+/-0,24
PCT, %	0,215%	0,161%	0,141%	0,0017+/-0
P-LCR, %	8,20%	3,10%	2,90%	0,047+/-0,03

Таблица 13 – Общий анализ крови группы №4

Показатель	№			
	1	2	3	
WBC, x10 ⁹ /L	12,1	20,4	3,2	11,9+/-9,73
LYM, x10 ⁹ /L	11,8	19,9	3,2	11,63+/-9,45
MID, x10 ⁹ /L	0,3	0,4	0	0,23+/-0,24
GRA, x10 ⁹ /L	0,0017	0,1	0	0,03+/-0,06
LYM%	97,6%	98%	99,6%	0,98+/-0,01
MID%	2,3%	2,20%	0,4%	0,02+/-0,01
GRA%	0,000020%	0%	0,000150%	0+/-0
RBC, x10 ¹² /L	5,03	5,7	4,18	4,97+/-0,86
HGB, g/L	74	90	62	75+/-15,9
MCHC, g/L	372	388	388	383+/-10,45
MCH, pg	14,7	15,8	14,8	15,1+/-0,69
MCV, fL	39,6	40,7	38,2	39,5+/-1,42
RDW-CV, %	14,2%	13,0%	14,5%	0,14+/-0,01
RDW-SD, fL	28,1	26,5	27,7	27,43+/-0,94
HCT, %	19,9%	23%	16%	0,2+/-0,04

PLT, $\times 10^9/L$	425	288	421	378 \pm 88,23
MPV, fL	5,1	5,4	5,1	5,2 \pm 0,2
PDW, fL	4,2	4,3	3,5	4 \pm 0,49
PCT, %	0,216%	0,156%	0,213%	0,002 \pm 0
P-LCR, %	0%	1,3%	1,1%	0,008 \pm 0,01

Таблица 14 – Биохимические показатели крови в эксперименте на онкопротекторные свойства

Показатель	Группа №1	Группа №2	Группа №3	Группа №4
АЛТ	44,07 \pm 29,72	49,64 \pm 8,5	49,27 \pm 33,08	42,83 \pm 19,97
АСТ	192,24 \pm 26,71	128,5 \pm 10,74	332,33 \pm 155,06	160,03 \pm 39,91
Креатинин	133,67 \pm 17,02	110,72 \pm 14,99	49,67 \pm 12,76	89 \pm 55,57
Мочевина	5,5 \pm 1,7	6,38 \pm 0,84	5,47 \pm 0,69	6,67 \pm 0,33
Фосфор	2,8 \pm 0,57	1,84 \pm 0,54	2,83 \pm 0,46	2,23 \pm 0,24

Таблица 15 – Биохимический анализ крови группы №1

Показатель	1	2	3	
АЛТ	32	26	74,2	44,07 \pm 29,72
АСТ	184,6	173,4	218,72	192,24 \pm 26,71
Креатинин	148	118	135	133,67 \pm 17,02
Мочевина	5,5	7	4	5,5 \pm 1,7
Фосфор	2,3	3,3	2,8	2,8 \pm 0,57

Таблица 16 – Биохимический анализ крови группы №2

Показатель	1	2	3	4	5	
АЛТ	33,4	54,5	54,8	48,1	57,4	49,64 \pm 8,5
АСТ	147,2	130	128,1	123,7	113,5	128,5 \pm 10,74
Креатинин	124,7	97,1	131,9	107,3	92,6	110,72 \pm 14,99
Мочевина	6,1	6,7	5,2	6,1	7,8	6,38 \pm 0,84
Фосфор	1,6	1,6	1,8	2,9	1,3	1,84 \pm 0,54

Таблица 17 – Биохимический анализ крови группы №3

Показатель	1	2	3	
АЛТ	31,4	83	33,4	49,27+/-33,08
АСТ	489,8	240,2	267	332,33+/-155,06
Креатинин	37	58,6	53,4	49,67+/-12,76
Мочевина	4,8	5,6	6	5,47+/-0,69
Фосфор	3,2	2,9	2,4	2,83+/-0,46

Таблица 18 – Биохимический анализ крови группы №4

Показатель	1	2	3	
АЛТ	45,5	59	24	42,83+/-19,97
АСТ	176	184,5	119,6	160,03+/-39,91
Креатинин	35	131	101	89+/-55,57
Мочевина	6,5	6,5	7	6,67+/-0,33
Фосфор	2,3	2	2,4	2,23+/-0,24

Также нами была составлена диаграмма массовых коэффициентов по всем полученным результатам для наглядности и оценки достоверности данных по доверительному интервалу (Рисунок 62-73). Достоверность результатов составляет 95%.

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

Достоверных отличий масс мышей между группами животных не отмечалось, тогда как коэффициент массы мышей в 4 группе концентраций лимфоцитов была достоверна выше чем во 2 и 3, 4 группе.

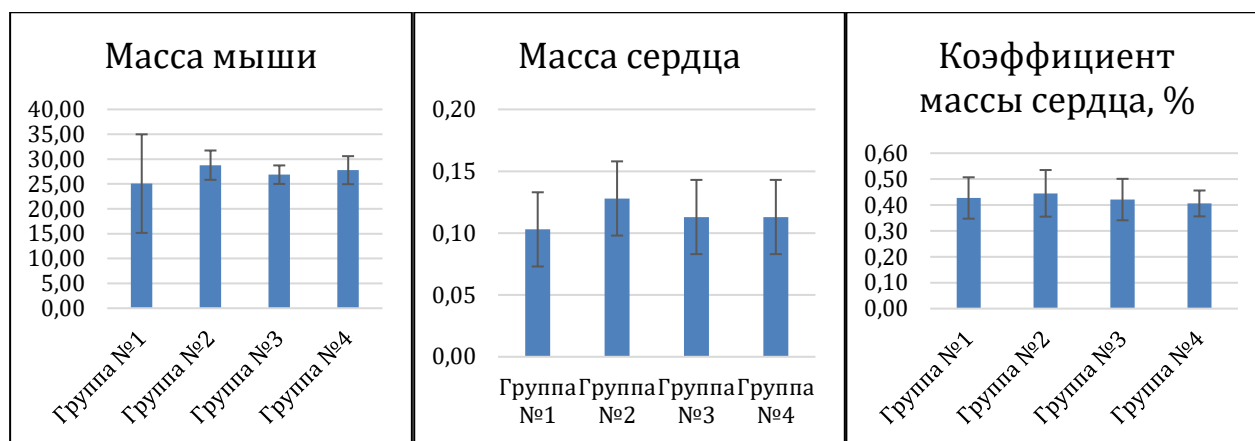


Рисунок 62 – Показатели массы животных и их органов в эксперименте на онкопротекторные свойства

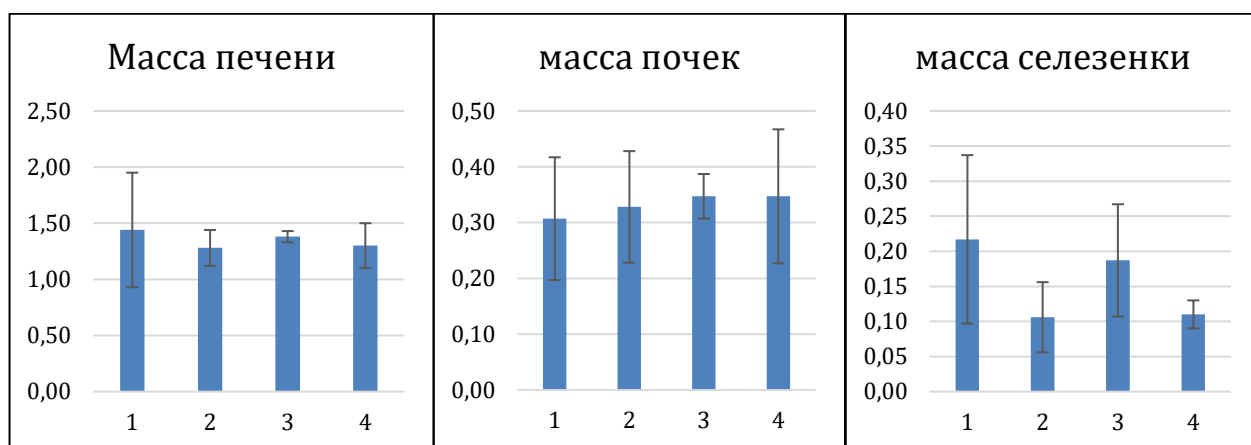


Рисунок 63 – Показатели массы органов животных и коэффициентов массы органов в эксперименте на онкопротекторные свойства

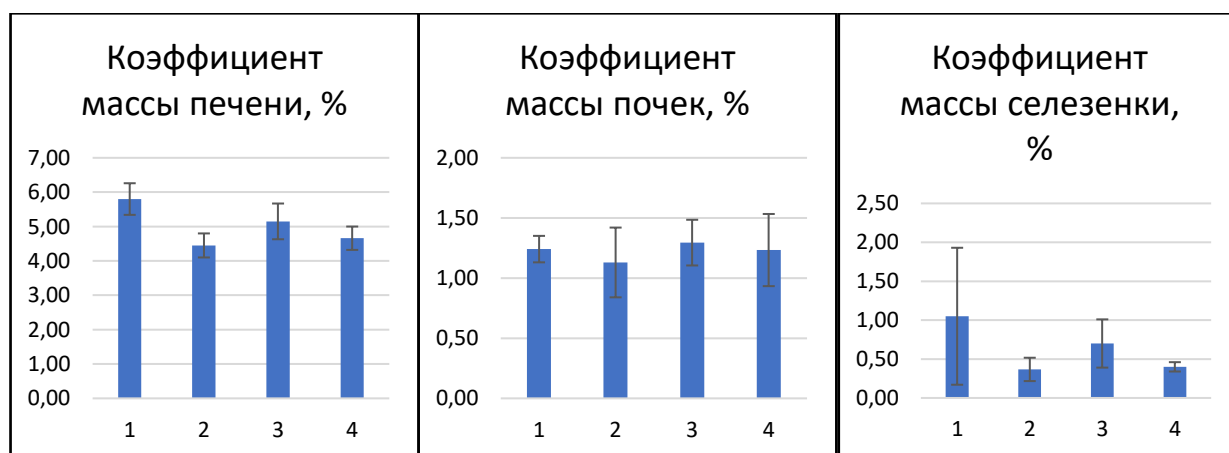


Рисунок 64 – Показатели коэффициентов массы органов в эксперименте на онкопротекторные свойства

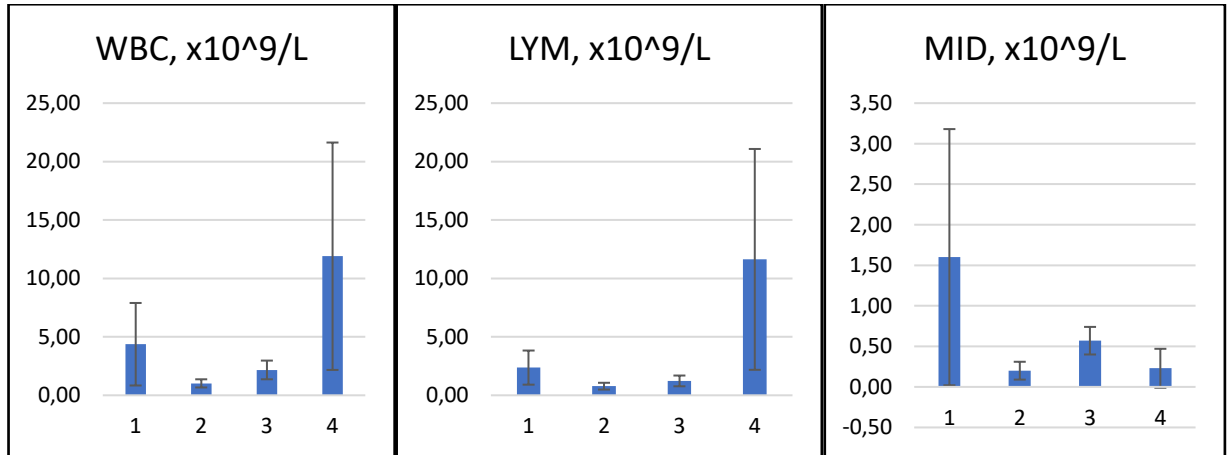


Рисунок 65 – Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротекторные свойства

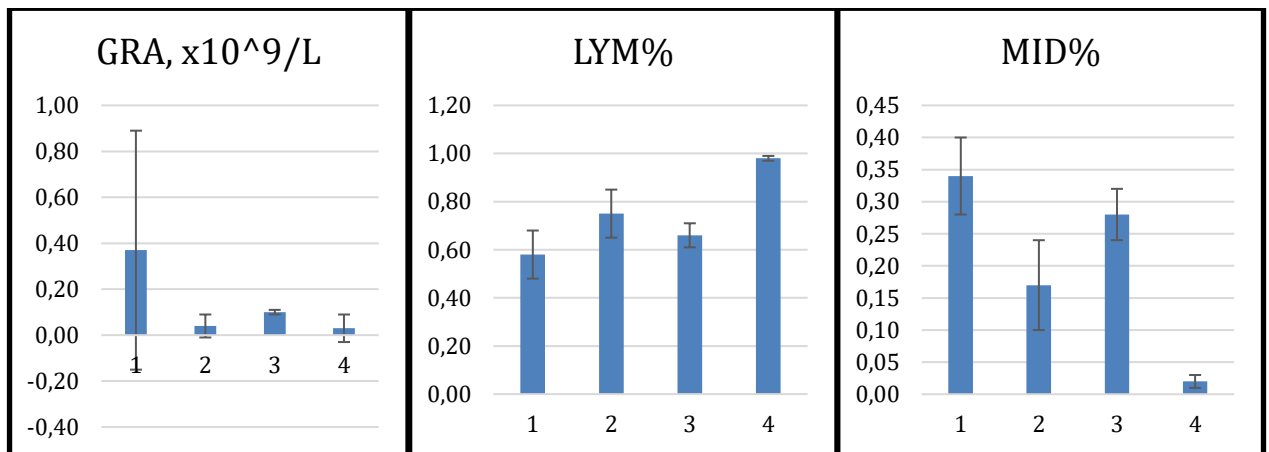


Рисунок 66 — Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротекторные свойства

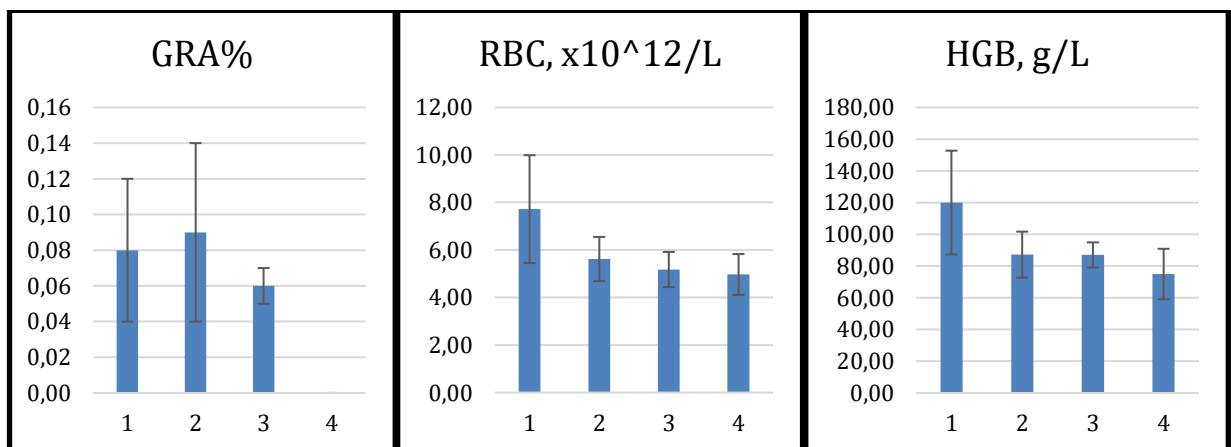


Рисунок 67 – Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротекторные свойства

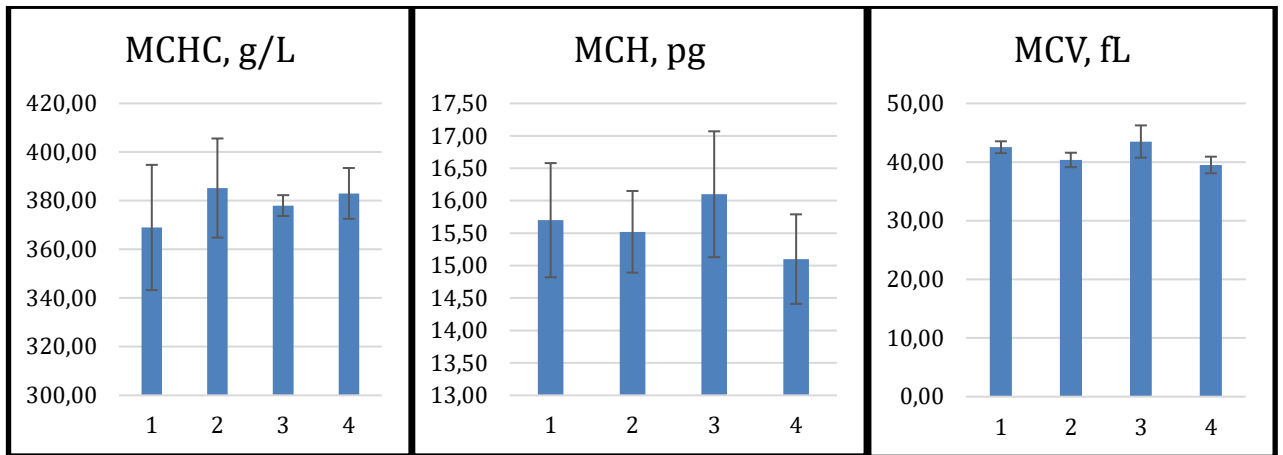


Рисунок 68 – Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротеткорные свойства

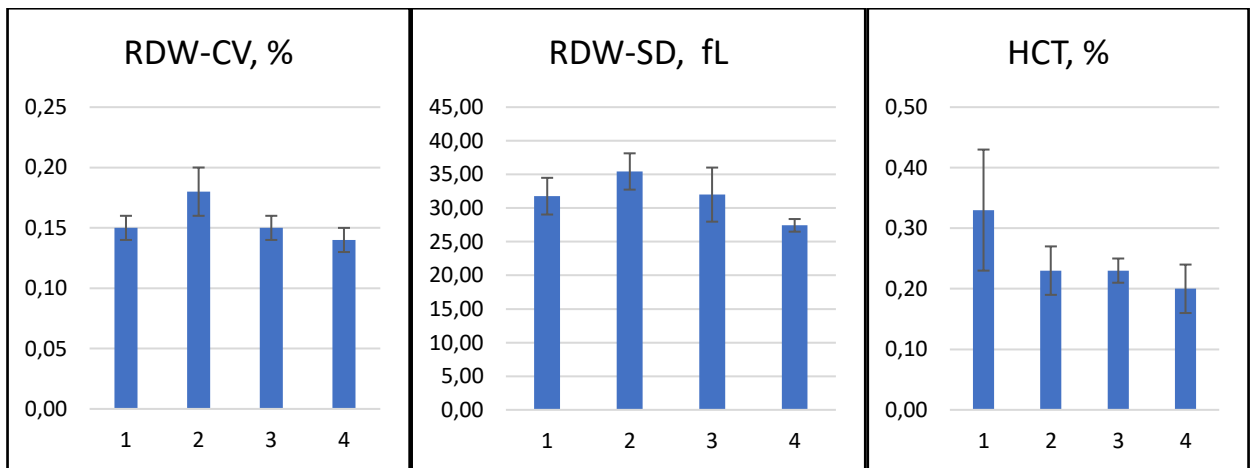


Рисунок 69 – Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротеткорные свойства

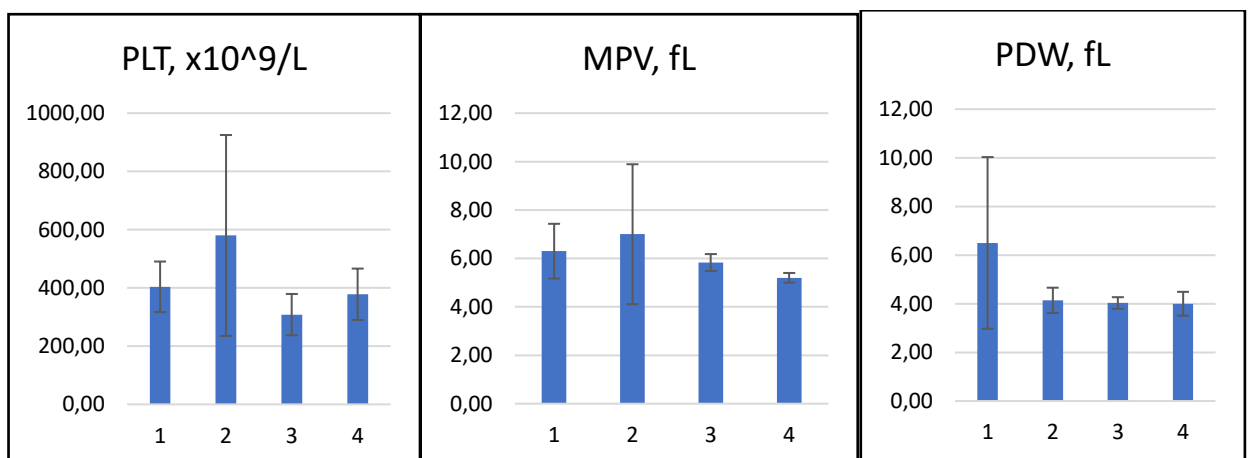


Рисунок 70 – Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротеткорные свойства

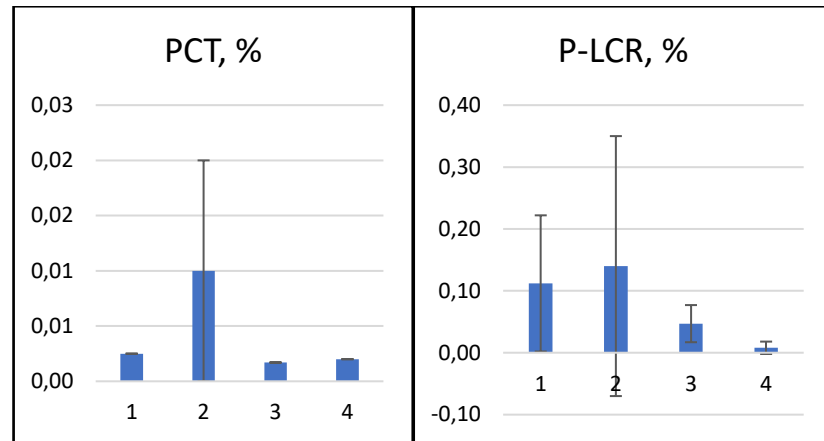


Рисунок 71 – Показатели общего анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротекторные свойства

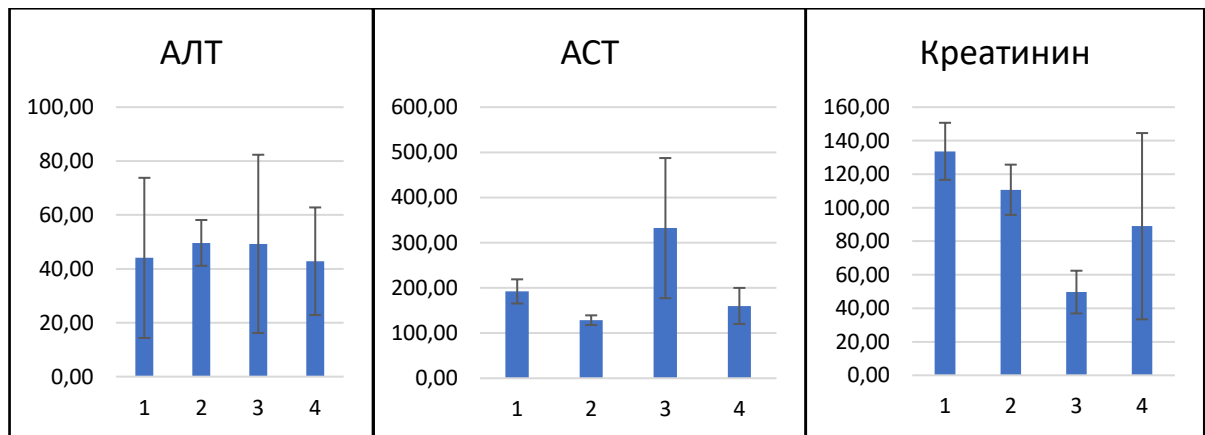


Рисунок 72 – Показатели биохимического анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротекторные свойства

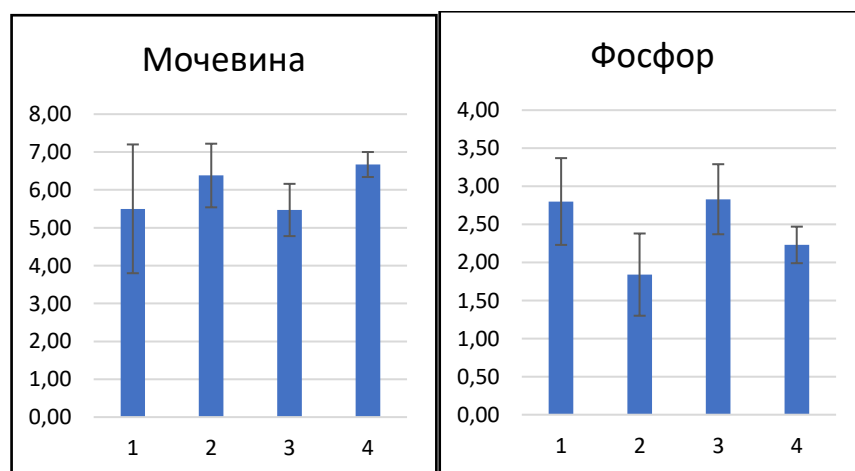


Рисунок 73 – Показатели биохимического анализа крови животных по группам в эксперименте на онкопротекторные свойства

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

2.2.7. 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. В соответствии с этим 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 внутривенно 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 ЛД₅₀/0,03 см³; срок наблюдения за инфицированными мышами составлял 14 суток. Учет проводился на 5 и на 14 сутки после контрольного заражения. Полученные результаты отражены в таблице (Таблица 19).

Таблица 19 – Оценка протективной активности наночастиц селена стабилизированных ПВП на белых нелинейных мышах

№ группы	Кол-во белых мышей	Разведение материала	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество мышей на 14 сут после КЗ	JJ, ME/cm ³
Контрольная вакцина: Проба №1					
1	16	1/5	13	13	1,75
2	16	1/25	13	13	
3	16	1/125	16	14	
4	16	1/625	12	9	
Испытуемая вакцина: Проба №2					
5	16	1/5	15	15	0,78
6	16	1/25	10	9	
7	16	1/125	13	9	
8	16	1/625	13	3	
Референс-вакцина: Проба №3					
9	16	1/5	12	11	1,8
10	16	1/25	14	13	
11	16	1/125	16	14	
12	16	1/625	14	9	

Одновременно на 40 невакцинированных мышах проводили контрольное титрование вируса, взятого для заражения. Полученные результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты титрования вируса на белых нелинейных мышах

Кол-во белых мышей	Разведение	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество павших мышей на 14 сутки после введения вируса
10	1/500	10	10
10	10 ⁻¹	10	9
10	10 ⁻²	10	7
10	10 ⁻³	10	1

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, формула (1)

$$\lg Kp_{50} = \lg \frac{\text{обратной величины исходного разведения}}{\frac{50\% - (\text{показатель смертности непосредственно ниже } 50\%)}{(\text{показатель смертности непосредственно выше } 50\%) - (\text{показатель смертности непосредственно ниже } 50\%)}} + \lg \text{кратности разведения.} \quad (1)$$

где Кр₅₀ – антилогарифм полученной величины.

Подставив имеющиеся значения из таблицы 19 в формулу 1 получаем:

Кр₅₀ = 2,67 у контрольной вакцины;

Кр₅₀ = 2,32 у испытуемой вакцины;

Кр₅₀ = 2,68 у референс-вакцины.

Аналогичным образом подставляем данные из таблицы 20 в формулу 1, получаем следующие данные:

Титр 2,2 Ig, что говорит о подтверждении разрешающей дозы тест-штамма вируса CVS, содержащую 5-50 ЛД₅₀/0,03 см³

Индекс иммуногенности (JJ) испытуемой вакцины определяют по формуле.

$$JJ = \frac{A}{B} \times Y, \quad (2)$$

где А - обратная величина 50% конечного разведения (Kp_{50}) испытуемой вакцины;
В - обратная величина 50% конечного разведения (Kp_{50}) референс-вакцины;
Y - индекс иммуногенности национальной референс-вакцины.

Индекс иммуногенности национальной референс-вакцины составляет 1,8 МЕ/см³.

Подставив имеющиеся значения конечного разведения (Kp_{50}) вакцины и референс-вакцины получаем:

Индекс иммуногенности (JJ) составляет у контрольной вакцины 1,75 МЕ/см³, у испытуемой вакцины 0,78 МЕ/см³.

В ходе исследования установлено, что индекс иммуногенности национальной референс-вакцины составляет 1,8 МЕ/см³, это соответствует международному стандарту.

Вместе с этим индекс иммуногенности (JJ) у контрольной вакцины (Проба №1) составил 1,75 МЕ/см³, у испытуемой вакцины с наночастицами селена в качестве адьюванта - 0,78 МЕ/см³ (Рисунок 74).

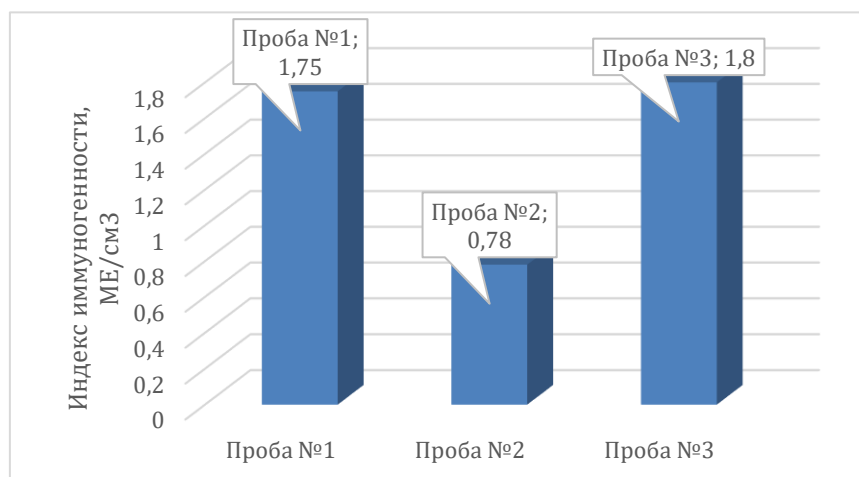


Рисунок 74 – Индекс иммуногенности изучаемых образцов вакцины «Рабикан» в эксперименте с применением наночастиц селена стабилизированных ПВП

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 наночастиц 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.

Результаты протективной активности изучаемых образцов вакцин представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Оценка протективной активности наночастиц селена стабилизированных хитозаном, на белых нелинейных мышах

№ группы	Кол-во белых мышей	Разведение материала	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество мышей на 14 сут после КЗ	JJ, ME/cm ³
Контрольная вакцина: Проба №1					
1	16	1/5	13	13	1,75
2	16	1/25	13	13	
3	16	1/125	16	14	
4	16	1/625	12	9	
Испытуемая вакцина: Проба №2					
5	16	1/5	11	9	0,60
6	16	1/25	12	10	
7	16	1/125	16	12	
8	16	1/625	14	4	

Референс-вакцина: Проба №3					
9	1/5	12	11	1/5	1,8
10	1/25	14	13	1/25	
11	1/125	16	14	1/125	
12	1/625	14	9	1/625	

Подставив имеющиеся значения из таблицы 21 в формулу 1 получили:

$Kp_{50} = 2,67$ у контрольной вакцины;

$Kp_{50} = 2,21$ у испытуемой вакцины;

$Kp_{50} = 2,68$ у референс-вакцины.

Подставив имеющие значения конечного разведения (Kp_{50}) вакцины и референс-вакцины получили:

Индекс иммуногенности (JJ) составляет у контрольной вакцины $1,75 \text{ ME/cm}^3$, у испытуемой вакцины стабилизированная наночастицами хитозана $0,60 \text{ ME/cm}^3$.

На рисунке 75 наглядно видно, что 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.

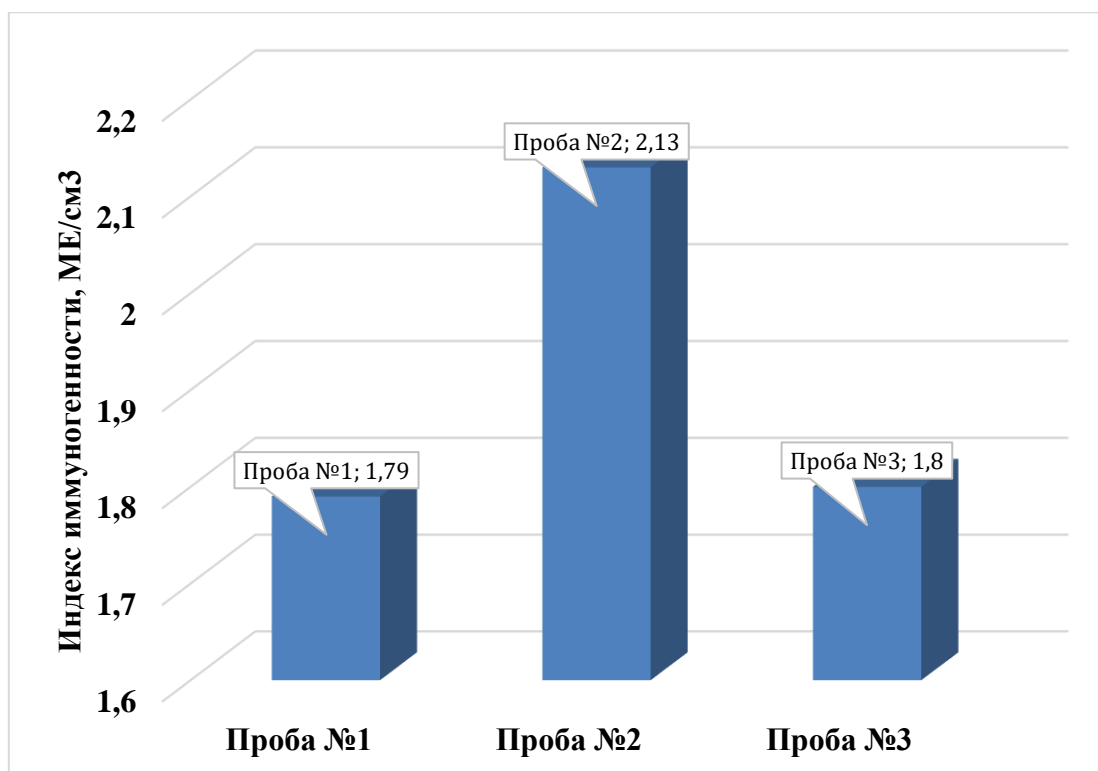


Рисунок 75 – Индекс иммуногенности изучаемых образцов вакцины «Рабикан» в эксперименте с применением наночастиц селена стабилизированных хитозаном

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.

Таким образом, использование наночастиц селена размером 2-4 нм стабилизированных как поливинилпирролидоном, так и хитозаном в качестве адьюванта, способствует снижению иммуногенности вакцины антирабической инактивированной сухой культуральной из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 80/80. Исходя из этого можно заключить, что наночастицы селена размером 2-4 нм с концентрацией 10 мг/мл в вакцине рабикан не обладают адьювантными свойствами, а скорее подавляют иммунный ответ на введение специфического антигена. 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.

Проведение эксперимента было аналогично предыдущему, и выполнялось по объемному методу Национальных Институтов Здравоохранения США (НИН) на белых мышах.

Результаты эксперимента по влиянию наночастиц селена используемых при иммунизации лабораторных животных совместно с вакциной Рабикан на ее иммуногенные свойства, в концентрации 3 и 0,3 мг/мл, представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Оценка протективной активности наночастиц селена, стабилизированных ПВП в концентрациях 3 и 0,3 мг/мл, на белых нелинейных мышах

№ группы	Кол-во белых мышей	Разведение материала	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество мышей на 14 сут после КЗ	JJ, ME/cm ³
Контрольная вакцина: Проба №1					
1	16	1/5	14	11	1,05
2	16	1/25	13	12	
3	16	1/125	14	12	
4	16	1/625	12	9	

Испытуемая вакцина: Проба №2					
5	16	1/5	15	11	1,1
6	16	1/25	13	11	
7	16	1/125	14	12	
8	16	1/625	11	10	
Референс-вакцина: Проба №3					
9	16	1/5	15	13	1,26
10	16	1/25	13	11	
11	16	1/125	15	12	
12	16	1/625	12	11	
Референс-вакцина: Проба №4					
13	16	1/5	15	14	1,8
14	16	1/25	12	11	
15	16	1/125	12	12	
16	16	1/625	10	8	

Одновременно на 40 невакцинированных мышах проводили контрольное титрование вируса, взятого для заражения. Полученные результаты представлены (Таблица 23).

Таблица 23 – Результаты титрования вируса на белых нелинейных мышах

Кол-во белых мышей	Разведение	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество павших мышей на 14 сутки после введения вируса
10	1/500	10	10
10	10 ⁻¹	10	9
10	10 ⁻²	10	9
10	10 ⁻³	10	3

Значение титра вируса составило 2,6 Ig, что подтверждает разрешающую дозу тест-штамма вируса CVS, содержащую 5-50 LD₅₀/0,03 см³, установленную в

предыдущем эксперименте.

Подставив полученные значения в формулу 1 из таблицы 22 получили следующие значения коэффициентов разведения вакцины:

$Kp_{50} = 2,6$ у контрольной вакцины;

$Kp_{50} = 2,6$ у испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 0,03 г;

$Kp_{50} = 2,7$ у испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 0,003 г;

$Kp_{50} = 2,89$ у референс-вакцины.

Подставив имеющиеся значения в формулу 2 получили:

Индекс иммуногенности (ИИ)

1,05 МЕ/см³ - контрольной вакцины;

1,1 МЕ/см³ - испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 3 мг/мл;

1,26 МЕ/см³ - испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 0,3 мг/мл.

На рисунке 76 наглядно видно, что индекс иммуногенности у вакцины с наночастицами стабилизированными ПВП в концентрации селена 3 мг/мл не отличается от контрольной вакцины, в то время как индекс иммуногенности Пробы №3 - вакцины с наночастицами стабилизированными ПВП в концентрации селена 0,3 мг/мл на 20% выше по сравнению с вакциной Рабикан, но ниже относительно референс-вакцины.

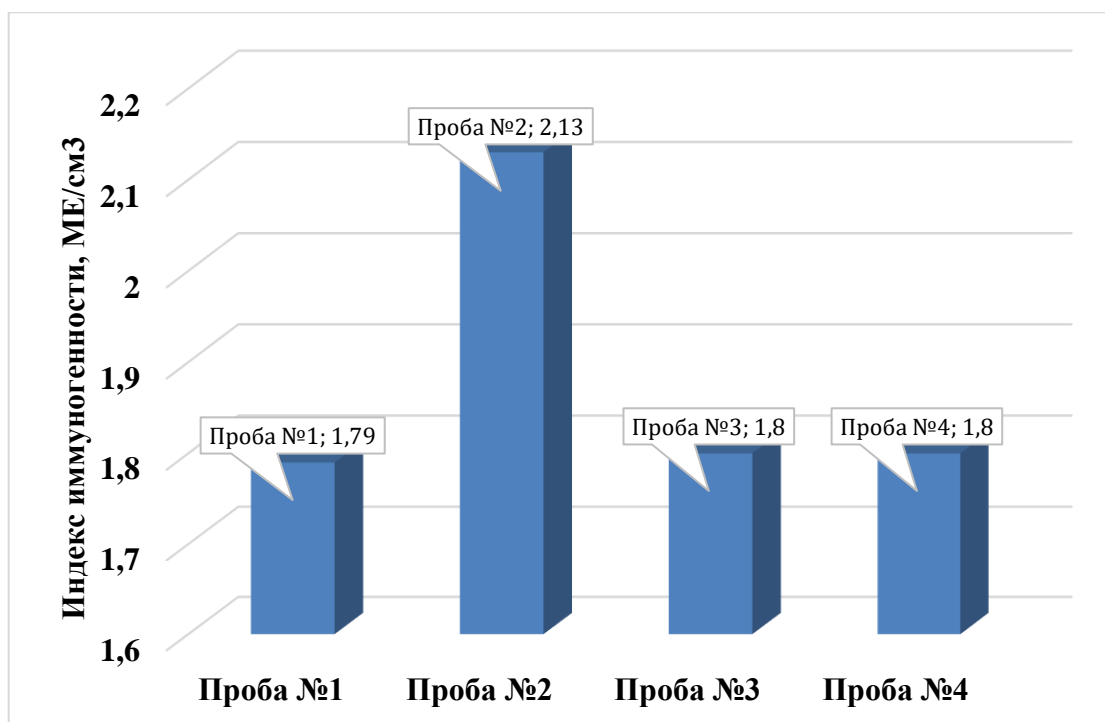


Рисунок 76 – Индекс иммуногенности изучаемых образцов вакцины «Рабикан» в эксперименте с применением наночастиц селена стабилизированных ПВП

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

Однако учитывая тот факт, что в данном эксперименте сама вакцина Рабикан проявила низкие иммуногенные свойства по сравнению с референс-вакциной, было принято решение повторно воспроизвести данные исследования с наночастицами селена стабилизированными ПВП в концентрации 0,3 мг/мл.

Для этого нами было принято решение добавить в антирабическую вакцину «Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» (Рабикан)» серии 90/80, наночастицы стабилизированные ПВП до концентрации 0,3 мг/мл.

Проведение эксперимента было аналогично предыдущему, и выполнялось по объемному методу Национальных Институтов Здравоохранения США (NIH) на белых мышах.

Результаты эксперимента по влиянию наночастиц селена используемых при иммунизации лабораторных животных совместно с вакциной Рабикан на ее иммуногенные свойства, в концентрации 0,3 мг/мл, представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Оценка протективной активности наночастиц селена стабилизированных ПВП в концентрации 0,3 мг/мл, на белых нелинейных мышах

№ группы	Кол-во белых мышей	Разведение материала	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество мышей на 14 сут после КЗ	JJ, ME/cm ³
Контрольная вакцина: Проба №1					
1	16	1/5	16	14	1,79
2	16	1/25	15	14	
3	16	1/125	14	11	
4	16	1/625	14	10	
Испытуемая вакцина: Проба №2					
5	16	1/5	15	14	2,13
6	16	1/25	13	12	
7	16	1/125	14	11	
8	16	1/625	13	10	
Референс-вакцина: Проба №3					
9	16	13	13		1,8
10	16	14	14		
11	16	16	12		
12	16	16	9		

Параллельно на 40 не вакцинированных мышах проводили контрольное титрование вируса CVS, взятого для заражения. Полученные результаты представлены в таблице (Таблица 25).

Таблица 25 – Результаты титрования вируса на белых нелинейных мышах

Кол-во белых мышей	Разведение	Количество мышей на 5 сут после КЗ	Количество павших мышей на 14 сутки после введения вируса
10	1/500	10	10
10	10^{-1}	10	9
10	10^{-2}	10	9
10	10^{-3}	10	2

Так же имеющие значения (Таблица 25) считали по формуле 1 получили следующие данные:

Титр 2,6 Ig, что говорит о подтверждении разрешающей дозы тест-штамма вируса CVS, содержащую 5-50 ЛД₅₀/0,03 см³.

Подставив полученные значения в формулу 1 из таблицы 24 получили:

$Kp_{50} = 2,66$ у контрольной вакцины;

$Kp_{50} = 2,73$ у испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 0,3 мг/мл;

$Kp_{50} = 2,66$ у референс-вакцины.

Подставив имеющие значения в формулу 2 получили:

Индекс иммуногенности (ИИ)

1,79 МЕ/см³ - контрольной вакцины;

2,13 МЕ/см³ - испытуемой вакцины с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном 0,3 мг/мл. Продемонстрировано наглядно в графике (Рисунок 77).

На рисунке 77 наглядно видно, что индекс иммуногенности у вакцины с наночастицами стабилизированными ПВП в концентрации селена 0,3 мг/мл значительно выше относительно контрольной пробы вакцины. Вместе с этим коммерческая вакцина Рабикан по итогам эксперимента, проведенного на белых нелинейных мышах, имеет индекс иммуногенности, как и референс-вакцины, что говорит о чистоте эксперимента.

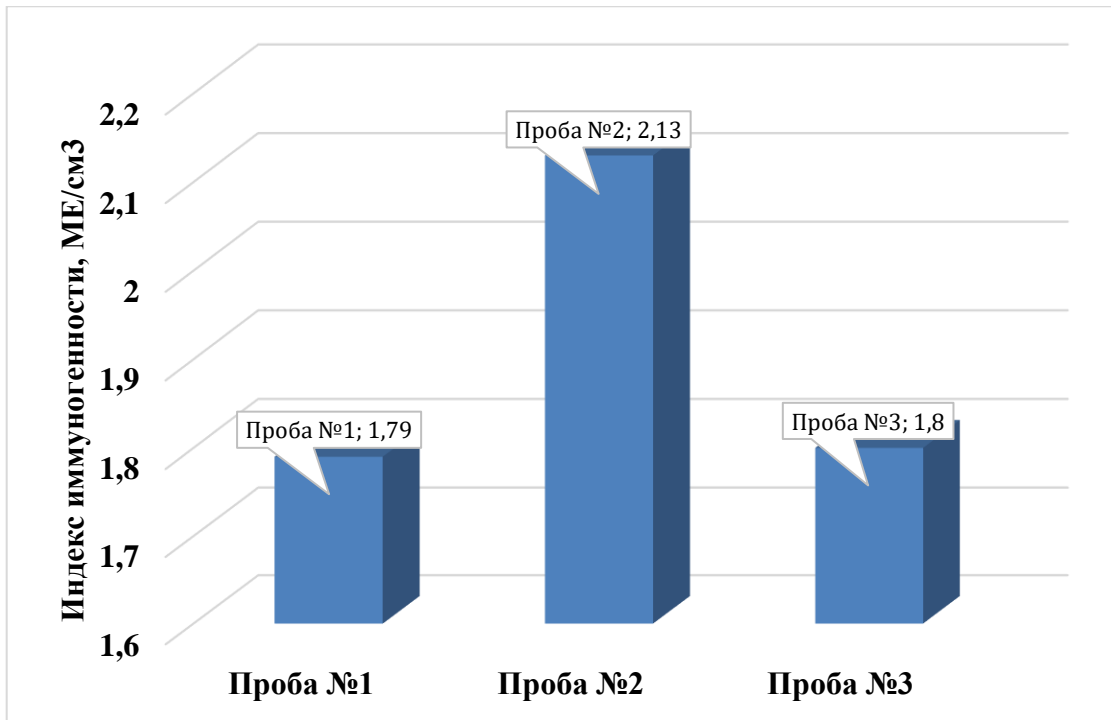


Рисунок 77 – Индекс иммуногенности изучаемых образцов вакцины «Рабикан» в эксперименте с применением наночастиц селена стабилизированных ПВП в концентрации 0,3 мг/мл

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.

В графике (Рисунок 78) указана зависимость концентрации наночастиц селена стабилизированных ПВП и от увеличения индекса иммуногенности в процентном соотношении в антирабической вакцине.

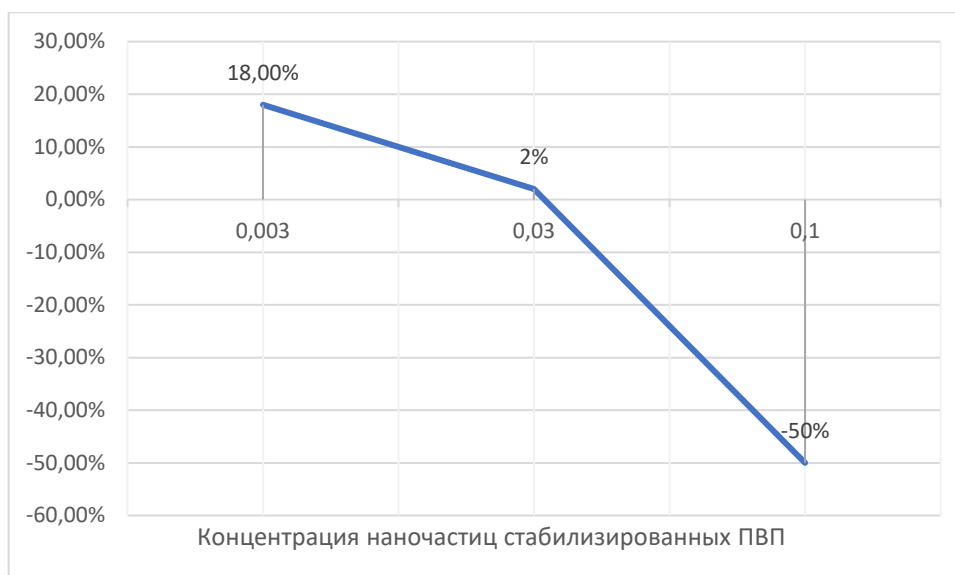


Рисунок 78 - зависимость концентрации наночастиц селена стабилизированных ПВП и от увеличения индекса иммуногенности в процентном соотношении в антирабической вакцине

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% сахара-пептон-желатинового стабилизатора с использованием как адъюванта наночастиц

стабилизированными поливинилпирролидоном, для применения профилактической вакцинации собак и кошек.

2.2.8. 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, за возможным выпадение осадки 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 (Рисунок 79), и для №21 в трех интервалах от 5,6 до 13,5, 24 – 79 и 220 -396 нм (Рисунок 80), а дзет-потенциал свидетельствующий о стабильности раствора в образце №7 с селенитом натрия составлял -12,5 мВ (Рисунок 81), а для образца № 21 с наночастицами селена составил -11,9 мВ (Рисунок 82).

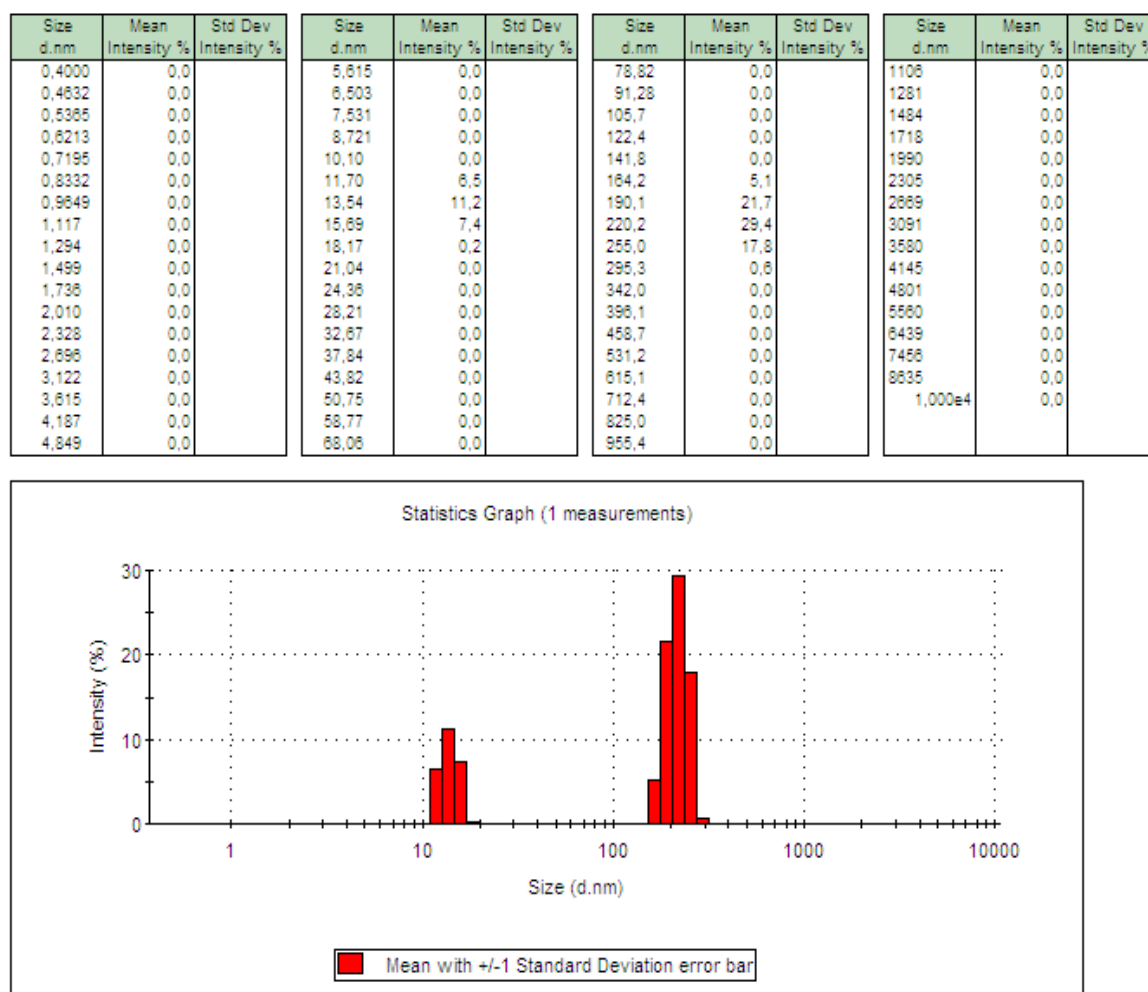


Рисунок 79 – Измерение размера частиц в растворе №7.

Size d.nm	Mean Intensity %	Std Dev Intensity %	Size d.nm	Mean Intensity %	Std Dev Intensity %	Size d.nm	Mean Intensity %	Std Dev Intensity %	Size d.nm	Mean Intensity %	Std Dev Intensity %
0,4000	0,0		5,615	1,5		78,82	0,3		1106	0,0	
0,4632	0,0		6,503	5,9		91,28	0,0		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	9,8		105,7	0,0		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	10,6		122,4	0,0		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	8,4		141,8	0,0		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	4,7		164,2	0,0		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	1,5		190,1	0,0		2669	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	3,1		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	8,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	10,9		4145	0,0	
1,738	0,0		24,38	0,1		342,0	9,1		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,8		396,1	3,9		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	2,2		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	3,7		531,2	0,0		7456	0,0	
3,122	0,0		43,82	4,8		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	4,9		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	3,7		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,08	1,8		955,4	0,0				

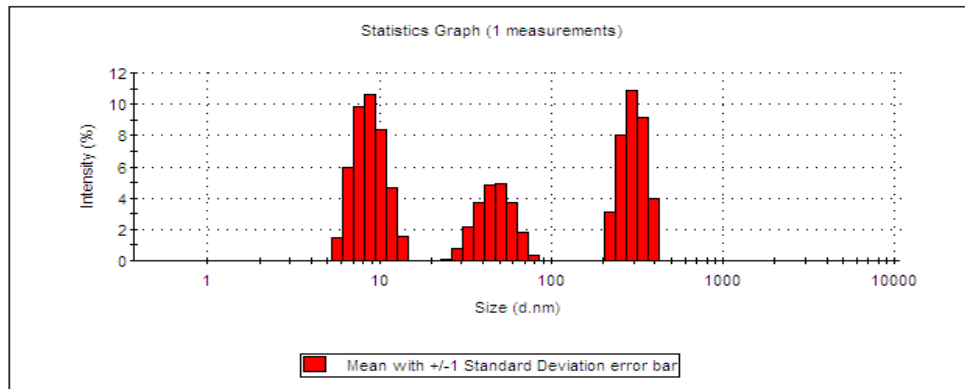


Рисунок 80 – Измерение размера частиц в растворе №21.

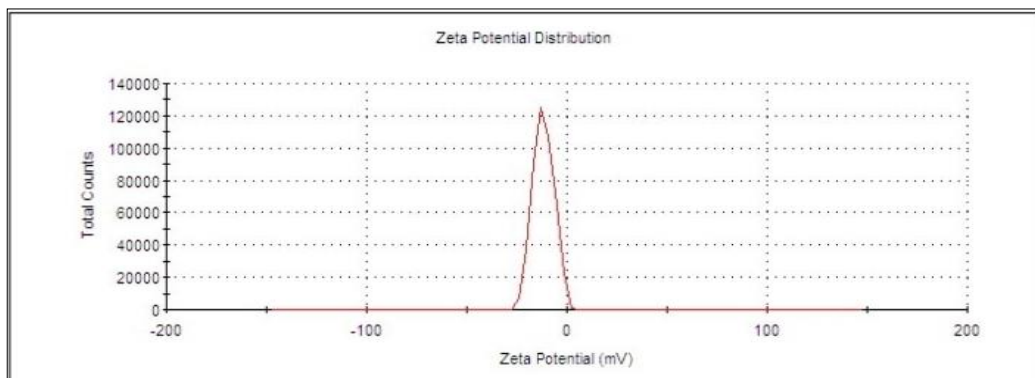


Рисунок 81 – Дзет-потенциал образца № 7

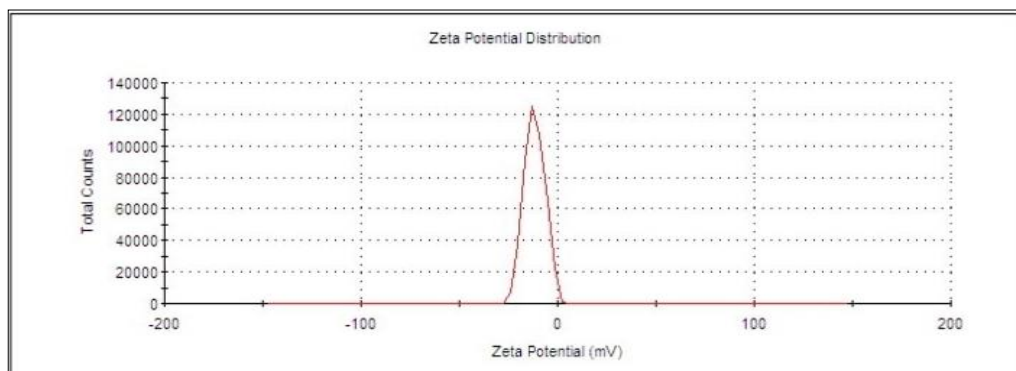


Рисунок 82 – Дзет-потенциал образца № 21

Результаты ДРС анализа показывают стабильные коллоидные растворы с высоким показателем дзет-потенциалом как для наночастиц селена, так и селенита натрия.

Для определения гепатопротекторных свойств образца №7 при индуцированном тетрахлорметаном экспериментальном гепатите были сформированы 4 группы белых нелинейных мышей. Первой группе из 20 голов внутрибрюшинно вводился 50% р-р 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. 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. В ходе изучения гепатопротекторных свойств на модели острого токсического гепатита смертность лабораторных животных за 7 дней эксперимента, составила в 16 группе 50%, во второй и третьей - 10%, в 46 группе (фоновой) признаков 5 интоксикации и гибели животных не отмечалось. При анализе гематологических показателей периферической крови мышей через 24 часа после начала эксперимента установлено достоверное повышение общего количества лейкоцитов у мышей с индуцированным тетрахлорметаном гепатитом по сравнению с контрольными животными. Увеличение общего количества лейкоцитов возникало за счет гранулоцитарных клеток. Данный факт указывает на развитие воспалительных процессов в организме животных, в частности в печени, пораженной действием тетрахлорметана. Кроме того, отмечается достоверное снижение эритроцитов и

гемоглобина в периферической крови мышечной первой опытной группы. При анализе биохимических показателей сыворотки крови мышечной установлено достоверное повышение индикаторных ферментов печени аланиновой и аспарагиновой трансаминаз в сыворотке крови мышечной через 24 часа после введения 50% раствора тетрахлорметана на оливковом масле относительно мышечной контрольной группы. Данные изменения указывают на способность четыреххлористого углерода запускать процессы перекисного окисления липидов и снижать интегральную антирадикальную активность в печени, что в свою очередь приводит к повреждению клеточных мембран центролобулярных долек печени. Следствием этого является выход цитоплазматических ферментов, к которым относятся и трансаминазы, в межклеточное пространство, откуда они поступают в кровь, где активность их резко возрастает. Наряду с этим, отмечается достоверное повышение активности щелочной фосфатазы, что указывает на процессы холестаза вследствие сдавливания желчных протоков экссудатом. Кроме того, отмечается резкое снижение концентрации глюкозы в сыворотке крови животных, что является следствием повышенных затрат энергии на компенсацию мезенхимально-дистрофических процессов в организме мышечной. Также через 24 часа после начала эксперимента у мышечной группы 1а наблюдается достоверное повышение мочевины и креатинина относительно контрольной группы животных. Данные изменения свидетельствуют о функциональной недостаточности почек в ответ на действие ксенобиотика. Так, снижение антитоксической функции печени при введении тетрахлорметана привело к накоплению токсических продуктов в организме животных, которые оказывают негативное влияние на почки, что и приводит к их повреждению.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови животных на 6 сутки эксперимента показал, что активность индикаторных ферментов печени, аланиновой и аспарагиновой трансаминаз во второй и третьей опытных группах, находится достоверно выше значений контрольной группы животных. Однако активность данных ферментов значительно ниже, чем в группе мышечной, 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, активирует 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 массы 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 группам 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.

Применение образца №7 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.

2.2.9. 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 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 прирост 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 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 %).

3 сутки

Количество проросших зерен, длина ростков и корней за третьи сутки приведены в таблице (Таблица 26).

Таблица 26 – Количество проросших зерен, длина ростков и корней за 3-7 сутки (мм)

№	3 сутки		5 сутки		7 сутки	
	Раствор 1-проросших зерен 19 из 50	Раствор 2 - проросших зерен 18 из 50	Раствор 1-проросших зерен 22 из 50	Раствор 2-проросших зерен 25 из 50	Раствор 1-проросших зерен 22 из 50	Раствор 2-проросших зерен 25 из 50
1	12	8	43	4	46	8
2	5	2	86	2	95	2
3	8	1	2	3	2	3
4	21	2	8	48	10	27
5	23	2	87	15	76	19
6	18	24	36	25	30	33
7	15	4	99	1	112	1
8	25	1	42	110	48	136
9	3	2	72	28	75	42
10	2	2	58	11	66	15
11	6	5	73	86	71	97
12	2	1	9	12	13	17
13	12	4	102	155	106	188
14	37	1	115	73	110	91
15	25	2	5	27	6	40
16	9	6	131	11	148	13
17	13	3	121	19	128	21
18	1	2	63	92	71	112
19	1	-	1	17	1	22
20	-	-	77	35	90	51
21	-	-	66	58	84	73
22	-	-	48	35	61	42
23	-	-	-	42	-	51
24	-	-	-	66	-	84
25	-	-	-	84	-	103

26-50	-	-	-	-	-	-
M+/-m	12,5+/-4,5	4+/-2,5	61,1+/-16,7	42,4+/-15,4	65,9+/-17,8	51,6+/-18,7

4 сутки

Полив образцов по 10 мл дистиллированной воды на каждый образец.

5 сутки

Количество проросших зерен, длина ростков и корней за пятые сутки приведены в таблице (Таблица 26).

6 сутки

Полив образцов по 10 мл дистиллированной воды на каждый образец.

7 сутки

Количество проросших зерен, длина ростков и корней за седьмые сутки приведены в таблице (Таблица 26)

8 сутки

Количество проросших зерен, длина ростков и корней за восьмые сутки приведены в таблице (Таблица 27)

Таблица 27 – Количество проросших зерен, длина ростков и корней за 7-10 сутки (мм)

№	8 сутки		9 сутки		10 сутки	
	Раствор 1-проросших зерен 22 из 50	Раствор 2-проросших зерен 25 из 50	Раствор 1-проросших зерен 20 из 50	Раствор 3-проросших зерен 23 из 50	Раствор 1-проросших зерен 20 из 50	Раствор 3-проросших зерен 22 из 50
1	49	10	62	21	81	37
2	108	2	133	45	156	47
3	3	3	26	37	40	44
4	12	31	110	56	131	67

5	88	23	51	211	73	232
6	35	40	140	72	163	91
7	118	1	77	27	92	41
8	51	150	82	15	102	174
9	79	43	94	158	109	45
10	68	18	103	33	121	289
11	78	113	21	256	42	175
12	15	19	144	142	167	89
13	112	195	156	77	173	35
14	125	110	15	25	9	46
15	8	51	211	38	256	197
16	166	18	188	162	212	56
17	137	28	89	44	105	93
18	76	136	122	71	147	130
19	1	31	115	95	135	82
20	93	66	88	66	102	91
21	91	81	-	77	-	155
22	65	53	-	134	-	183
23	-	60	-	169	-	-
24	-	93	-	-	-	-
25	-	115	-	-	-	-
26-50	-	-	-	-	-	-
M+/- m	71,7+/-19,4	59,6+/-20,4	101,4+/-23	88,3+/-27,1	120,8+/-25,9	109+/-30,2

9 сутки

Количество проросших зерен, длина ростков и корней за девятые сутки приведены в таблице (Таблица 27)

10 сутки

Количество проросших зерен, длина ростков и корней за десятые сутки приведены в таблице (Таблица 27)

Средняя длина ростков и корней у проросших семян, по дням (мм.) представлена в таблице (Таблица 28).

Таблица 28 – Средняя длина ростка и корня у проросших семян (мм.)

Показатель	Образец	3 день	5 день	7 день	8 день	9 день	10 день
Средняя длина ростка и корня	Дист. Вода 50мл	12,5	61,1	65,8	71,7	101,3	120,8
	Дист. Вода 50мл + нано Se.0,0125г.	4	42,3	51,6	59,6	88,3	109,1
Энергия прорастания семян	Дист. Вода 50мл	19/50 38%	22/50 44%	22/50 44%	22/50 44%	20/50 40%	20/50 40%
	Дист. Вода 50мл + нано Se. 0,0125г.	18/50 36%	25/50 50%	25/50 50%	25/50 50%	23/50 46%	22/50 44%
Дружность прорастания	Дист. Вода 50мл	19%	11%	7,3%	6,3%	5%	4,4%
	Дист. Вода 50мл + нано Se. 0,0125г.	18%	12,5%	8,3%	7,1%	5,7%	4,8%

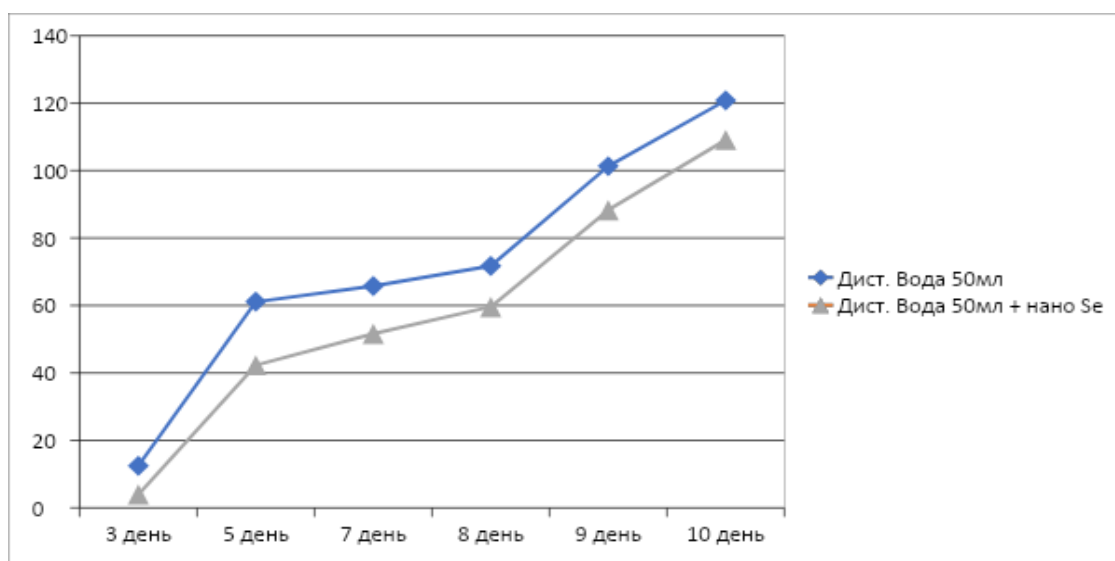


Рисунок 83 – Средняя скорость роста семян (мм)

Энергия прорастания семян и всхожесть – это количество проросших семян, которые соответствуют стандарту, корешки, равные половине длины семени и более, а ростки равны длине семени и более (в %)

Энергия прорастания семян, соответствующих стандарту и всхожесть зерен предоставлены в таблице (Таблица 28).

Дружность прорастания (Таблица 28)

$$\text{Др. пр.} = \frac{\text{Всхожесть}}{\text{число дней прорастания}} (\%) \quad (3)$$

Таким образом 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.

Исследование влияния на особенности физиологических процессов у проростков яровой ржи на начальных этапах онтогенеза.

Мы провели исследования возможности роста и физиологических изменений в ростовых процессах яровой ржи при использовании селеносодержащих веществ, на примере наночастиц селена синтезированных из диацетофенонилселенида.

При анализе суточной динамики роста было установлено, что раствор с добавлением наноселена обладает наибольшей ростостимулирующей активностью (Рисунок 83).



Рисунок 84 – Суточная динамика роста семян яровой ржи, нижняя линия образец при обработке семян дистиллированной водой, верхняя образец при обработке семян дистиллированной водой с наночастицами селена

Общая динамика роста также доказывает, что селенсодержащие соединения оказывают благотворное влияние на рост и развитие семян яровой ржи.



Рисунок 85 – Динамика роста семян яровой ржи, нижняя линия образец при обработке семян дистиллированной водой, верхняя образец при обработке семян дистиллированной водой с наночастицами селена

Динамика роста семян с использованием наночастиц селена показывает увеличение динамики роста семян на 91% по отношению к воде и на ~25% по отношению к наночастицам.

Заключение

Разработка новых методов синтеза наночастиц является актуальной задачей из-за широкого спектра возможных способов применения их в сельском хозяйстве и других отраслях промышленности. Особый интерес представляет синтез наночастиц селена, в отличие от металлических наночастиц данные наночастицы представляют высокий интерес как из-за биологической активности как самих наночастиц, так и селена как микроэлемента незаменимого в жизнедеятельности животных и растений.

Для синтеза наночастиц нами были синтезированы два селеноорганических соединения, которые обладая низкой стабильностью являются удобными поставщиками селена для синтеза наночастиц - это дихлордиацетофенонилселенид и диацетофенонилселенид.

При получении наночастиц из дихлордиацетофенонилселенида было установлено образование при использовании в качестве стабилизатора поливинилпирролидона наночастиц селена размером 2-4 нм по данным электронной микроскопии. Использование метода просвечивающей электронной микроскопии для определения размера наночастиц является наиболее достоверным, однако, требует сложного оборудования и обладает высокой стоимостью, кроме этого данный метод анализа на твердом носителе не дает представления о размере наночастицы в растворе, так как не учитывает размер стабилизирующей оболочки состоящей из поверхностно активных веществ и растворителя, находящегося, видимо, в стабильной системе наночастицы за счет Ван-дер-Ваальсовых сил, что учитывается при анализе методом динамического рассеяния света (ДРС), где нами было установлено, что размер данных частиц составлял 50 нм, при этом было учтено, что данный метод анализа построен на использовании уравнения Эйнштейна-Стокса, которое коррелирует между собой вязкость-скорость движения частиц и их размер. Для этого были проведены исследования растворов с различной концентрацией и в различных растворителях, и установлены оптимальные концентрации для анализа. В частности, было

установлено, что оптимальная концентрация наночастиц в воде составляет от 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл, в меньшей или большей концентрации данный метод анализа не дает достоверные результаты. При этом при замене воды на диметилсульфоксид наблюдалось изменение размера частиц, что свидетельствует о зависимости размера частиц от растворителя, в частности от его полярности и самого размера молекул. При замене поливинилпирролидона на Кремофор А-25 было установлено, что при использовании аммиака размер наночастиц составлял от 6 до 18 нм по данным ДРС, при использовании сульфата аммония от 18 до 59 нм, при применении аскорбиновой кислоты от 43 до 220 нм. Полученные выше данные свидетельствуют о том, что размер образующихся частиц находится в зависимости и от реагента, применяемого для более быстрого разрушения селеноорганической молекулы.

При получении наночастиц селена из диацетофенонилселенида, были использованы такие вещества для стабилизации, как: хитозан, поливинилпирролидон, сахароза, TWEEN 80, Кремофор А-25. В качестве компонента, стабилизирующего наночастицы селена, применялся хитозан, после чего было установлено образование наночастиц селена размером, при использовании просвечивающего электронного микроскопа, от 4 до 6 нм, а при определении методом ДРС от 43 до 255 нм. При замене хитозана на поливинилпирролидон метод ДРС показал размер от 43 до 342 нм. При использовании сахарозы по данным полученным ДРС размер составлял от 37 до 220,2 нм. При этом для установления дальнейшей возможности использования наночастиц в качестве инъекционных препаратов были проведены эксперименты по оценки возможности стерилизации наиболее распространенным в промышленности методом – автоклавированием, так как данный метод обладает низкой себестоимостью, показал стабильность раствора наночастиц селена при температуре 120 °С на протяжении 60 минут. Для создания стабильных наночастиц так же 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. Реакцию проводили при температуре 25 °С, на протяжении 60 суток не наблюдалось выпадения осадка. Размер по ДРС от 37 нм до 220 нм. Аналогичная картина наблюдалась и при проведении синтеза при температуре 17 °С по данным ДРС размер составил от 43 до 220,2 нм, а при 50 °С под воздействием аммиака анализ ДРС показал размер от 91 нм до 955,4 нм.

Ранее нами было установлено образование наночастиц селена в присутствии TWEEN-80 из диацетофенонилселенида, однако данный метод синтеза наночастиц имеет 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. Поэтому нами был осуществлен синтез наночастиц селена из диацетофенонилселенида с Кремофором А-25.

Так как полученные результаты имели широкий интервал, а для исследования на биологическую активность необходимо использование одинаковых по размеру наночастиц, было принято решение по замене аммиака на сульфат аммония, что в аналогичных условиях позволило получать наночастицы более однородного размера при ДРС анализе от 32 нм до 202,2 нм, со средним размером 58,83 нм при использовании аскорбиновой кислоты размер составил от 43 нм 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 нами для создания более «мягких» условий образования селена из диацетофенонилселенида был использован метионин, размером частиц в данном случае от 164 до 295,3 нм. Что

говорит о большей однородности полученных наночастиц относительно аскорбиновой кислоты и аммиака.

Наночастицы селена размером 2-4 нм были исследованы на острую токсичность и установлено, 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.

Нами были проведены исследования и местно-раздражающего действия наночастиц селена из дихлордиацетофенонилселенида стабилизированных поливинилпирролидоном. Обследование животных проводили следующим образом. Осматривали поверхность участков, где проводили провокационную пробу подопытных и контрольных животных, через 24; 48 ч после снятия повязки. Для визуализации реакций кожи рекомендуется использование естественного освещения или освещения с полным спектром. Описывали и оценивали степень кожной реакции, включая эритему и отек для каждого участка. Анализируя полученные результаты были сделаны следующие выводы, что участок С имеет умеренную эритему и припухлость.

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, в частности

гиперэкспрессией фермента α -глицерофосфатдегидрогеназы и субъединицы ГАМК-канала, клеточным полиморфизмом, высокой генетической гетерогенностью, что делает GBM устойчивым к терапии.

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

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. В соответствии с этим нами была предпринята попытка установления влияния наночастиц стабилизированных ПВП в антирабической вакцине. Для усиления иммунного ответа взято 0,1 г 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.

Из полученных данных следует что испытываемая вакцина с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном с содержанием 3 мг/мл увеличивает иммунный ответ на 20%.

Из полученных данных следует что испытываемая вакцина с наночастицами стабилизированными поливинилпирролидоном с содержанием 0,3 мг/мл, увеличивает иммунный ответ на 18 %.

В рамках данной работы были разработаны предварительные рецептуры, которые могут быть использованы для восстановления гепатобилиарной системы млекопитающих, основанные на фосфотидилхолине, метионине, витамине Е и селене который может быть представлен либо в виде классического селенита натрия или наночастиц селена. Так как гепатобилиарная система это целый

комплекс внутренних органов, работающих совместно, то наиболее оптимальным является сочетание воздействий так же комплекса действующих веществ, который сможет повысить эффективность работы данных внутренних органов, в частности фосфотидилхолина, который является фосфолипидом, входящим в состав структуры оболочек клеток и органел, которые при болезнях печени обычно имеют повреждения, метионина - незаменимой аминокислоты, которая является донором метильных групп для синтеза холина и фосфолипидов для реализации липотропного эффекта, витамина Е, который обладает антиоксидантным действием, участвует в биосинтезе гема и белков, пролиферации клеток, тканевом дыхании, других важнейших процессах тканевого метаболизма, предупреждает гемолиз эритроцитов, препятствует повышенной проницаемости и ломкости капилляров, стимулирует синтез белков и коллагена и селена представленного в виде селенита натрия или наночастиц селена – который необходим для работы антиоксидантной системы и иммунитета. Выбор формы селена в виде селенита натрия или наночастиц селена обусловлен тем, что селенит натрия на данный момент времени является основным действующим веществом для восполнения дефицита данного элемента в организме млекопитающих, однако обладает высокой токсичностью в отличии от наночастиц селена, которые с высокой биоусвояемостью одновременно имеют низкую токсичность.

Также 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 селеносодержащих веществ, на примере наночастиц селена синтезированных из

диацетофенонилселенида и диацетофенонилселенида (DAFS-25). Динамика роста семян с использованием наночастиц селена показывает увеличение динамики роста семян на 91% по отношению к воде и на ~25% по отношению к диацетофенонилселениду (препарат DAFS-25).

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.

Выводы

1. Разработан новый метод синтеза наночастиц селена из диацетофенонилселенида и дихлордиацетофенонилселенида.

2. Определены размеры получаемых частиц методом электронной просвечивающей микроскопии и методом динамического рассеивания (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, адъюванта 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 ростстимулирующее 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, адъювантов для вакцин и восполнения дефицита селена в организме млекопитающих. Данные частицы могут применяться в качестве антимикробных препаратов и ростстимулирующих средств.

Список используемой литературы

1. Барабой, В.А. Биологические функции. метаболизм и механизм действия селена. Успехи современной биологии / В.А. Барабой // Журнал успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124, № 2. – С. 157–168.
2. Валуева, С.В. Влияние соотношения компонентов комплекса селен: поливинилпирролидон на формирование и морфологические характеристики наноструктур / С.В. Валуева, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер // Журнал физической химии. – 2008. – № 6. – Т. 82. – С. 1131–1136. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=10008435&ysclid=ln5ryvi64d545911099>
3. Голубкина, Н. А. Некоторые особенности аккумуляции селена тканями и органами животных / Н. А. Голубкина, В. И. Беляев, Т. Е. Мельникова // Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных. – Воронеж: Изд-во Воронежский государственный университет, 2004. – С.193-197.
4. Пат. 2572716 Российская Федерация. Способ получения растворимой в воде формы 2,4-дифенил-7,8-бензо-5,6- дигидроселенохромена / Я.Б. Древко, Б.И. Древко, О.С. Ларионова, С.В. Козлов, Т.С. Ситникова (Осина). - RUS 257271C1 ; опубл. 20.01.2016, Бюл. №2
5. Перспектива использования мицеллярной формы нового селенорганического соединения / Я.Б. Древко, Б.И. Древко, О.С. Ларионова [и др.] // Биотехнология: реальность и перспективы: Материалы межд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2014. – С. 149-151.
6. Юркова, И. Н. Влияние наночастиц селена и селенита натрия на рост и развитие растений пшеницы / И. Н. Юркова, А. В. Омельченко // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – 2015. – Т. 1 (67), № 3. – С. 99-106.
7. A development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity / S.R. Wilson, P.A. Zucker, R. Huang, A.J. Spector // Journal of the American Chemical Society. – 1989. – V. 111. – P. 5936-5939.

8. A novel biologically active seleno-organic compound I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (ebselen) / A. Müller, E. Cadenas, P. Graf, H. Sies // *Biochemical Pharmacology*. – 1984. – V. 33. – P. 3235-3239.
9. A novel biologically active seleno-organic compound-II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase / A. Wendel, M. Fausel, H. Safayhi [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 1984. – V. 33. – P. 3241-3246.
10. A water-soluble cyclic selenide with enhanced glutathione peroxidase-like catalytic activities / F. Kumakura, B. Mishra, K.I. Priyadarsini, M. Iwaoka // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – V. 3. – P. 440-445.
11. Acute exposure of rabbits to diphenyl diselenide: a toxicological evaluation / M.R. Stralio, G. Mancini, O.J. de [et al.] // *Journal of Applied Toxicology*. – 2010. – V. 30. – P. 761-768.
12. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups / M. Farina, F.A. Soares, G. Zeny [et al.] // *Toxicology Letters*. – 2004. – V.146. – P. 227-23.
13. Allmang, C. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story / C. Allmang, A. Krol // *Biochimie*. – 2006. – V. 88. – P. 1561-1571.
14. Allmang, C. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated / C. Allmang, L. Wurth, A. Krol // *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. – 2009. – V. 1790. – P.1415-1423.
15. Beyth, N. Alternative antimicrobial approach: nanoantimicrobial materials / N. Beyth, Y. Houry-Haddad, A. Domb // *Evid Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2015. – V. 2015. – P. 246-012.
16. Antibacterial activity of biosynthesized selenium nanoparticles using extracts of *Calendula officinalis* against potentially clinical bacterial strains / J.A. Hernández-Díaz, J. J. Garza-García, J. M. León-Morales [et al.] // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2021. – V. 26, N. 19. – P. 5929.
17. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide / C. W. Nogueira, E.B. Quinhones, E.A. Jung [et al.] // *Inflammation Research*. – 2003. – V. 52. – P. 56-63.

18. Antimicrobial activity of Se-nanoparticles from bacterial biotransformation / M.C. Escobar-Ramírez, A. Castañeda-Ovando, E. Pérez-Escalante [et al.] // *Fermentation*. – 2021. – V. 7. – P. 130.
19. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using microbial biosurfactant produced by a newly isolated *Bacillus vallismortis* MDU6 strain / M. Das, D. Borah, K. Patowary [et al.] // *IET Nanobiotechnology*. – 2019. – V. 13, N. 9. – P. 967–973.
20. Antimycobacterial effect of selenium nanoparticles on *Mycobacterium tuberculosis* / H. Estevez, A. Palacios, D. Gil [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 800.
21. Antimycobacterial effect of selenium nanoparticles on *Mycobacterium tuberculosis* / H. Estevez, A. Palacios, D. Gil [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 800.
22. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action / L. Savegnago, L.G. Pinto, C.R. Jesse [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – V. 555. – P. 129-138.
23. Antioxidant profile of ethoxyquin and some of its S, Se, and Te analogues / S. Kumar, L. Engman, L. Valgimigli [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2007. – V. 72. – P. 6046-6055.
24. Antioxidant enzyme activity in the muscles of calves depleted of vitamin E or selenium or both / D. M. Walsh, D. G. Kennedy, E. A. Goodall, S. Kennedy // *British Journal of Nutrition*. – 1993. – V. 70. – P. 621–630.
25. Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound / D. Plano, Y. Baquedano, E. Ibanez, I. Jimenez // *Molecules*. – 2010. – V. 15. – P. 7292-7312.
26. Araie, H. Selenium utilization strategy by microalgae / H. Araie, Y. Shiraiwa // *Molecules*. – 2009. – V. 14. – P. 4880-4891.
27. Arner, E. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase / E. Arner, A. Holmgren // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – V. 267. – P. 6102-6109.

28. Arteel, G.E. Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocystine or ebselen / G.E. Arteel, K. Briviba, H. Sies // *Chemical Research in Toxicology*. – 1999. – V. 12. – P. 264-269.
29. Arteel, G.E. The biochemistry of selenium and the glutathione system / G.E. Arteel, H. Sies // *Environ Toxicol Phar.* – 2001. – V. 10. – P.153-158.
30. Arthur, J. R. The glutathione peroxidases / J.R. Arthur // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2002. – V. 57. – P. 1825–1835.
31. Arthur, J. R. The glutathione peroxidases / J.R. Arthur // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2000. – V. 57. – P. 1825–1835.
32. Back, T.G. A novel camphor-derived selenamide that acts as a glutathione peroxidase mimetic / T.G. Back, B.P. Dick // *Journal of Medicinal Chemistry*. –1997. – V. 119. – P. 2079-2083.
33. Back, T.G. Diselenides and allyl selenides as glutathione peroxidase mimetics. Remarkable activity of cyclic seleninates produced in situ by the oxidation of allyl omega-hydroxyalkyl selenides / T. G. Back, Z. Moussa // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – V. 125. – P. 13455-13460.
34. Back, T.G. Remarkable activity of a novel cyclic seleninate ester as a glutathione peroxidase mimetic and its facile in situ generation from allyl 3-hydroxypropyl selenide / T.G. Back, Z.J. Moussa // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – V. 124. – P. 12104-12105.
35. Back, T.G. The exceptional glutathione peroxidase-like activity of di(3-hydroxypropyl) selenide and the unexpected role of a novel spirodioxaselenanonane intermediate in the catalytic cycle / T.G. Back, Z. Moussa, M. Parvez // *Angewandte Chemie*. – 2004. – V. 43. – P. 1268-1270.
36. Benzoselenazolinone derivatives designed to be glutathione peroxidase mimetics feature inhibition of cyclooxygenase/5-lipoxygenase pathways and anti-inflammatory activity / V. Galet, J.L. Bernier, J.P. Hénichart [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1994. – V. 37. – P. 2903-2911.

37. Bhabak, K.P. A simple and efficient strategy to enhance the antioxidant activities of amino-substituted glutathione peroxidase mimics / K. P. Bhabak, G. Mugesh // *Chemistry: A European Journal*. – 2008. – V. 14. – P. 8640-8651.
38. Bhabak, K.P. Amide-based glutathione peroxidase mimics: effect of secondary and tertiary amide substituents on antioxidant activity / K.P. Bhabak, G. Mugesh // *Chemistry: An Asian Journal*. – 2009. – V. 4. – P. 974-983.
39. Bhabak, K.P. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants / K.P. Bhabak, G. Mugesh // *Accounts of Chemical Research*. – 2010. – V. 43. – P.1408-1419.
40. Bhabak, K.P. Synthesis and structure-activity correlation studies of secondary- and tertiary-amine-based glutathione peroxidase mimics / K.P. Bhabak, G. Mugesh // *Chemistry: A European Journal*. – 2009. – V. 15. – P. 9846-9854.
41. Bhabak, K.P. Synthesis, characterization, and antioxidant activity of some ebselen analogues / K.P. Bhabak, G. Mugesh // *Chemistry: A European Journal*. – 2007. – V. 13. – P. 4594-4601.
42. Biogenic selenium nanoparticles (SeNPs) from citrus fruit have anti-bacterial activities / G.B. Alvi, M.S. Iqbal, M.M. Ghaith [et al.] // *Science and Reports*. – 2021. – V. 11, N. 1. – P. 4811.
43. Biological levels of cadmium, zinc, copper, and selenium in patients with colon cancer / A. Darago, T. Rzetecki, A. Dziki, A. Sapota // *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*. – 2005. – V. 38, N. 4. – P. 371-376.
44. Biomimetic studies on iodothyronine deiodinase intermediates: modeling the reduction of selenenyl iodide by thiols / G. Mugesh, W.D. Mont, C. Wismach, P. Jones // *Chembiochem*. – 2002. – V. 3. – P. 440-447.
45. Björnstedt, M. Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase / M. Björnstedt, S. Kumar, A. Holmgren // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – P. 8030-8034.
46. Bock, A. Selenocysteine - the 21st amino-acid / A. Bock, K. Forchhammer, J. Heider // *Molecular Microbiology*. – 1991. – V. 5. – P. 515-520.

47. Borah, D. A novel 'green' synthesis of antimicrobial silver nanoparticles (AgNPs) by using *Garcinia morella* (Gaertn) Desr fruit extract / D. Borah, A.K. Yadav // *Nanoscience and Nanotechnol Asia*. – 2015. – V. 5, N. 3. – P. 25-31.
48. Borges, V.C. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats / V.C. Borges, J. Rocha, C. W. Nogueira // *Toxicology*. – 2005. – V. 215. – P. 191-197.
49. Boyne, R. The response of selenium deficient mice to *Candida albicans* infection / R. Boyne, J. R. Arthur // *The Journal of Nutrition*. – 1986. – V. 116. – P. 816-822.
50. Brigger, I. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis / I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2002. – V. 54, N. 5. – P. 631-65.
51. Burk, R.F. Regulation of selenoproteins / R.F. Burk, K.E. Hill // *Annual Review of Nutrition*. – 1993. – V. 13. – P. 65-81.
52. Chai, Q. *Mycobacterium tuberculosis*: An adaptable pathogen associated with multiple human diseases / Q. Chai, Y. Zhang, C.H. Liu // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2018. – V. 8. – P. 158.
53. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods / B.A. de, R. Portella, J. Perottoni [et al.] // *Chem Biol Interact*. – 2006. – V. 162. – P. 1-10.
54. Chaudière, J. Glutathione oxidase activity of selenocystamine: a mechanistic study / J. Chaudière, O. Courtin, J. Leclaire // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1992. – V. 296. – P. 328-336.
55. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety / J.E. Cone, R. Del, J.N. Davis, T.C. Stadtman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1976. – V. 73. – P. 2659-2663.
56. Chen, G.P. Liver microsome and flavin-containing monooxygenase catalyzed oxidation of organic selenium-compounds / G.P. Chen, D.M. Ziegler // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1994. – V. 312. – P. 566-572.
57. Chen, J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases / J. Chen, M.J. Berry // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – V. 86. P. 1-12.

58. Cholamali, K. The effects of selenium nanoparticles (SeNPs) on oxidant and antioxidant activities and neonatal lamb weight gain pattern / K. Cholamali, A. Fatemeh, M. Abdolnaser // *Pathology* volume. – 2020. – V. 29. – P. 369-374.
59. Chronic treatment with fluphenazine alters parameters of oxidative stress in liver and kidney of rats / C. C. Dalla, R. Fachinetto, R. Puntel [et al.] // *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*. – 2009. – V. 105. – P. 51-57.
60. Combining benzo[d]isoseleazol-3-ones with sterically hindered alicyclic amines and nitroxides: enhanced activity as glutathione peroxidase mimics / T. Kalai, G. Mugesh, G. Roy [et al.] // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2005. – V. 3. – P. 3564-3569.
61. Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice / E.N. Maciel, E.M. Flores, J.B. Rocha, V. Folmer // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2003. – V. 70. – P. 470-476.
62. Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na⁺/K⁺ ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain / I.J. Kade, M.W. Paixão, O.E. Rodrigues // *Neurochemical Research*. – 2008. – V. 33. – P. 167-178.
63. Convenient synthesis, characterization and GPx-like catalytic activity of novel ebselen derivatives / S.S. Zade, S. Panda, S.K. Tripathi [et al.] // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2004. – V. 18. – P. 3857-3864.
64. Convulsant action of diphenyl diselenide in rat pups: measurement and correlation with plasma, liver and brain levels of compound / M. Prigol, S. Pinton, R. Schumacher [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2010. – V. 84. – P. 373-378.
65. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels / M. Prigol, R.F. Schumacher, C.W. Nogueira, G. Zeni // *Toxicology Letters*. – 2009. – V.189. P. 35-39.
66. Cooper, A. Multiple roles of glutathione in the central nervous system / A. Cooper, B. Kristal // *Biological Chemistry*. – 1997. – V. 378. – P. 793-802.

67. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers / C.A. Costa, G.C. Trivelato, A.M. Pinto, E. J. Bechara // *Clinical Chemistry*. – 1997. – V. 43. – P. 1196-1202.
68. Davis, R.L. Inhibition of selenite-catalyzed superoxide generation and formation of elemental selenium (Se degrees) by copper, zinc, and aurotricarboxylic acid (ATA) / R.L. Davis, J.E. Spallholz // *Biochemical Pharmacology*. – 1996. – V. 51. – P. 1015-1020.
69. De-Koning, A.J. The antioxidant ethoxyquin and its analogues: a review / A.J. De-Koning // *International Journal of Food Properties*. – 2002. – V. 5. – P. 451- 461.
70. Delta-Aminolevulinate dehydratase inhibition by phenyl selenoacetylene: effect of reaction with hydrogen peroxide / R.C. Bolzan, V. Folmer, M. Farina [et al.] // *Pharmacol Toxicol*. – 2002. – V. 90. – P. 214-219.
71. Diphenyl diselenide and 2, 3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice / V.B. Brito, V. Folmer , G.O. Puntel [et al.] // *Brain Research Bulletin*. – 2006. – V. 68. – P. 414-418.
72. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice / M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch [et al.] // *Pharmacol Toxicol*. – 2001. – V. 88. – P. 119-125.
73. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice / E.N. Maciel, R.C. Bolzan , A.L. Braga, J. Rocha // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2000. – V. 14. – P. 310-319.
74. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice / E.N. Maciel, R.C. Bolzan ,A.L. Braga, J. Rocha // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. – 2000. – V. 14. – P. 310-319.
75. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice / V.B. Brito, J.B. Rocha, V. Folmer, F. Erthal // *Acta Biochimica Polonica*. –2009. – V. 56. – P. 125-134.

76. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors / N.B. Barbosa, C.W. Nogueira, T.N. Guecheva [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2008. – V. 82. – P. 655-663.
77. Doraiswamy, P.M. Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease / P.M. Doraiswamy, G.L. Xiong // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2006. – V. 7, N. 1. – P. 1-10.
78. Dringen, R. Metabolism and functions of glutathione in brain / R. Dringen // *Progress in Neurobiology*. – 2000. – V. 62. – P. 649-671.
79. Dual effect of ebselen on mitochondrial permeability transition / D. Morin, R. Zini, H. Ligeret [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2003. – V. 65. – P. 1643-1651.
80. Dubey, J. P. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States / J.P. Dubey, J. L. Jones // *International Journal for Parasitology*. – 2008. – V. 38, N. 11. – P. 1257-1278.
81. Dubey, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis / J. P. Dubey // *Veterinary Parasitology*. – 2004. – V. 126. – P. 57-72.
82. Dumont, E. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review / E. Dumont, F. Vanhaecke, R. Cornelis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2006. – V. 385. – P. 1304-1323.
83. Dupont, C. D. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis / C. D. Dupont, D. A. Christian, C. A. Hunter // *Seminars in Immunopathology*. – 2014. – V. 34. – P. 793–813.
84. Dupont, C. D. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis / C.D. Dupont, D.A. Christian, C.A. Hunter // *Seminars in Immunopathology*. – 2012. – V. 34. – P. 793-813.
85. Ebselen augments its peroxidase activity by inducing nrf-2-dependent transcription / V. Tamasi, J.M. Jeffries, G.E. Arteel, K.C. Falkner // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – V. 431. – P. 161-168.
86. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile / T. Sakurai, M. Kanayama, T. Shibata, [et al.] // *Chemical Research in Toxicology*. – 2006. – V. 19. – P. 1196-1204.

87. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats / N. Barbosa, J. Roch, M. Beque [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. –1998. – V. 149. – P. 243-253.
88. Effect of selenium exposure on the immunological function in mice / Y. Feng, Z. Ying-mei, W. Bing-liag [et al.] // *Huanjing Yu Zhiye Yxue*. – 2006. – V. 23, N. 1. – P. 38-40.
89. Effect of selenium form and salicylic acid on the accumulation of selenium speciation forms in hydroponically grown lettuce / I. Kowalska, S. Smoleń, M. Czernicka [et al.] // *Agric*. – 2020. – V. 10. – P. 584.
90. Effects of chitosan-modified selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies / H. Estevez, J.C. Garcia-Lidon, J.L. Luque-García, C. Cámara // *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. – 2014. – V. 122. – P. 184-193.
91. Effects of Different Dietary Selenium Sources Including Probiotics Mixture on Growth Performance, Feed Utilization and Serum Biochemical Profile of Quails / V. Bityutskyy, S. Tsekhmistrenko, O. Tsekhmistrenko [et al.] // *Modern Development Paths of Agricultural Production*. – 2019. V. 8, N. 3. – P. 623-632.
92. Effects of sub-lethal doses of selenium nanoparticles on the health status of rats / L. Urbankova, S. Skalickova, M. Pribilova [et al.] // *Toxics*. –2021. – V.9, N. 2. – P. 28.
93. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania Major*: In vitro and in vivo studies / N. Beheshti, S. Soflaei, M. Shakibaie [et al.] // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2013. – V. 27. – P. 203-207.
94. Engineered nanoparticles with antimicrobial property / V.G. Reshman, S. Syama, S. Sruthi [et al.] // *Current Drug Metabolism*. – 2017. – V. 18. – P. 1040-1054.
95. Evidence for a common selenolate intermediate in the glutathione peroxidase-like catalysis of A-(phenylselenenyl) ketones and diphenyl diselenide / L. Engman, C. Andersson, R. Morgenstern [et al.] // *Tetrahedron*. – 1994. – V. 50. – P. 2929-2938.
96. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life / A.V. Lobanov, D.E. Fomenko, Y. Zhang [et al.] // *Genome Biology*. – 2007. – V. 8. – P. 198.

97. Facile biogenic synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) by *Citrus grandis* (L.) Osbeck fruit extract with excellent antimicrobial potential against plant pathogens / B. Gogoi, R. Kumar, J. Upadhyay, D. Borah // *SN Applied Sciences*. – 2020. – V. 2. – P. 1723.
98. Fischer, H. Mechanism of the catalytic reduction of hydroperoxides by ebselen: a selenium-77 NMR study / H. Fischer, N. Dereu // *Bulletin Des Societes Chimiques Belges*. – 1987. – V. 96. – P. 757-768.
99. Fisinin, V.I. Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population / V.I. Fisinin, T.T. Papazyan, P.F. Surai // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2009. – V. 29. – P.18-28.
100. Flohe, L. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme / L. Flohe, W. Gunzler, H. Schock // *FEBS Letters*. – 1973. – V. 32. – P. 132-134.
101. Forstrom, J.W. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as a selenocysteine / J.W. Forstrom, J.J. Zakowski, A.L. Tappel // *Biochemistry*. – 1978. – V.17. – P. 2639-2644.
102. Foster, L. Selenium in health and disease: a review / L. Foster, S. Sumar // *Crit. Rev. Food Sci Nutr*. – 1997. – V. 37. – P. 211-228.
103. Franke, K.W. Selenium in proteins from toxic foodstuffs: IV. The effect of feeding toxic proteins, toxic protein hydrolysates, and toxic protein hydrolysates from which the selenium has been removed / K.W. Franke, E.P. Painter // *Journal of Nutrition*. – 1935. – V.10. – P. 599-611.
104. Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro / B. Huang, J. Zhang, J. Hou, C. Chen // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – V. 35, N. 7. – P. 805-813.
105. Frost, D.V. The two faces of selenium - can selenophobia be cured? / D.V. Frost, O.E. Olson // *Critical reviews in toxicology*. – 1972. – V.1. – P. 467-514.
106. Ganther, H.E. Selenotrisulfides formation by reaction of thiols with selenious acid / H.E. Ganther // *Biochemistry*. – 1968. – V. 7. – P. 2898-2905.

107. Ghose, A. Selenium and signal transduction: roads to cell death and anti-tumour activity / A. Ghose, J. Fleming, P.R. Harrison // *Biofactors*. – 2001. – V. 14. – P. 127-133.
108. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study / G. Mugesh, A. Panda, H.B. Singh [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – V. 123. – P. 839-850.
109. Gunti, L. Phytofabrication of selenium nanoparticles from *Emblica officinalis* fruit extract and exploring its biopotential applications: Antioxidant, antimicrobial, and biocompatibility / L. Gunti, R.S. Dass, N.K. Kalagatur // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 30, N. 10. – P. 931.
110. Hatfield, D. L. How selenium has altered our understanding of the genetic code / D. L. Hatfield, V. N. Gladyshev // *Molecular and Cellular Biology*. – 2002. – V. 22. – P. 3565–3576.
111. Hemolysate thioredoxin reductase and glutathione peroxidase activities correlate with serum selenium in a group of New Zealand men at high prostate cancer risk / N. Karunasinghe, L.R. Ferguson, J. Tuckey; J. Masters // *Journal of Nutrition*. – 2006. – V. 136, N. 8. – P. 2232-2235.
112. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro / D.B. Santos, V.P. Schiar, M.W. Paixao [et al.] // *Toxicol In Vitro*. – 2009. – V. 23. – P. 1195-1204.
113. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation / H. Pfeifer, M. Conrad, D. Roethlein [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2001. – V. 15, N. 7. – P. 1236–1238.
114. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. / V. Valdiglesias, E. Pasaro, J. Mendez, B. Laffon // *Arch Toxicol*. – 2010. – V. 84. – P. 337-351.
115. Inhibitory effect of ebselen on lactate dehydrogenase activity from mammals: a comparative study with diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride / T.H. Lugokenski, L.G. Müller, P.S. Taube [et al.] // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2011. – V. 34. – P. 66-76.

116. Involvement of oxidative stress in seizures induced by diphenyl diselenide in rat pups / M. Prigol, E.A. Wilhelm, C.C. Schneider [et al.] // Brain Research. – 2007. – V. 147. – P. 226-232.
117. Iwaoka, M. A model study on the effect of an amino group on the antioxidant activity of glutathione peroxidase / M. Iwaoka, S. Tomoda // Journal of the American Chemical Society. – 1994. – V. 116. – P. 2557-2561.
118. Jacobs, M. Toxicological effects of sodium selenite in Sprague-Dawley rats / M. Jacobs, C. Frost // Journal of Toxicology and Environmental Health. – 1981. – V. 8. – P. 575-585.
119. Jacquemin, P.V. Synthesis of 2H, 3-4-Dihydro-1, 2-benzoselenazin-3-one and derivatives : a new heterocyclic ring system / P.V. Jacquemin, L.E. Christiaens, M.J. Renson // Tetrahedron Lett. – 1992. – V. 33. – P. 3663-3866.
120. Johnson, W.D. Subchronic oral toxicity studies of Se-methylselenocysteine, an organoselenium compound for breast cancer prevention / W.D. Johnson, R.L. Morrissey, I. Kapetanovic // Food and Chemical Toxicology. – 2008. – V. 46. – P. 1068-1078.
121. Jung, C.H. Ebselen has dehydroascorbate reductase and thioltransferase-like activities / C.H. Jung, M.P. Washburn, W.W. Wells // Biochem Biophys Res Commun. – 2002. – V. 291. – P. 550-553.
122. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51) / M. Maiorino, A. Roveri, M. Coassin, F. Ursini // Biochemical Pharmacology. – 1988. – V. 37. – P. 2267-2271.
123. Kiremidjian-Schumacher, L. Selenium and immune function / L. Kiremidjian-Schumacher, M. Roy // Z. Ernährungswiss. – 1998. – V. 37. – P. 50–56.
124. Kitahara, J. Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes / J. Kitahara, Y. Seko, N. Imura // Archives of Toxicology. – 1993. – V. 67. – P. 497-501.
125. Krysiak, R. The effect of vitamin D and selenomethionine on thyroid antibody titers, hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity and thyroid function tests in men

- with Hashimoto's thyroiditis: A pilot study / R. Krysiak, W. Szkróbka, B. Okopień // Reportsvolume. – 2019. – V. 71. – P. 243-247.
126. Kryukov, G. V. Mammalian selenoprotein gene signature: identification and functional analysis of selenoprotein genes using bioinformatic methods. / G. V. Kryukov, V. N. Gladyshev // *Methods in Enzymology*. – 2002. – V. 347. – P. 84-100.
127. Kumar, S. Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen / S. Kumar, M. Björnstedt, A. Holmgren // *European Journal of Biochemistry*. – 1992. – V. 207. – P. 435-439.
128. Lee, N. Y. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms / N.Y. Lee, W.C. Ko, P.R. Hsueh // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – V. 10. – P. 1153.
129. Lescure, A. Novel selenoproteins identified from genomic sequence data / A. Lescure, D. Gautheret, A. Krol // *Methods in Enzymology*. – 2002. – V. 347. – P. 57-70.
130. Lobanov, A.V. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes / A.V. Lobanov, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev // *Biochem Biophys Acta (general subjects)*. – 2009. – V. 1790. – P. 1424-1428.
131. Lower antioxidant vitamins (A, C and E) and trace minerals (Zn, Cu, Mn, Fe and Se) status in patients with cerebrovascular disease / K. In-Sook; P. Kyoung-Hee; J. Hyun-Sook [et al.] // *Nutritional Neuroscience*. – 2005. – V. 8, N. 4. – P. 251-257.
132. Lu, J. Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase / J. Lu, C. Berndt, A. Holmgren // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – V. 1790. – P.1513-1519.
133. Lu, J. Selenoproteins / J. Lu, A. Holmgren // *J Biol Chem*. – 2009. – V. 284. – P. 723-730.
134. Luchese, C. Diphenyl diselenide in its selenol form has dehydroascorbate reductase and glutathione S-transferase-like activity dependent on the glutathione

- content / C. Luchese, C.W. Nogueira // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2010. – V. 62. – P.1146-1151.
135. Macrophage-specific targeting of isoniazid through mannosylated gelatin microspheres / S. Tiwari, A.P. Chaturvedi, Y.B. Tripathi, B. Mishra // *AAPS PharmSciTech*. – 2011. – V. 12, N. 3. – P. 900-908.
136. Macrophage-targeted isoniazid-selenium nanoparticles promote antimicrobial immunity and synergize bactericidal destruction of tuberculosis bacilli / J. Pi, L. Shen, E. Yang [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – V. 59, N. 8. – P. 3226-3234.
137. Mechanism of the reaction of ebselen with endogenous thiols / G. Haenen, B. de, N. Vermeulen, A. Bast // *Molecular Pharmacology*. – 1990. – V. 37. – P. 412-422.
138. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain / M. Farina, R. Brandao, F.S. Lara [et al.] // *Toxicology Letters*. – 2003. – V. 139. – P. 55-66.
139. Methyl phenyl selenide causes heme biosynthesis impairment and its toxicity is not modified by dimethyl sulphoxide in vivo / V. Folmer, M. Farina, E.N. Maciel [et al.] // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2004. – V. 27. – P. 331-340.
140. Micke, O. Selenium in oncology: from chemistry to clinics / O. Micke, L. Schomburg, J. Buentzel // *Molecules*. – 2009. – V. 14. – P. 3975-3988.
141. Mitochondrial dysfunction induced by different organochalcogens is mediated by thiol oxidation and is not dependent of the classical mitochondrial permeability transition pore opening / R. L. Puntel, D.H. Roos, V. Folmer [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2010. – V. 117. – P. 113-143.
142. Moghimi, S.M. Nanomedicine: current status and future prospects / S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray // *The FASEB Journal*. – 2005. – V. 19, N. 3. – P. 311-330.
143. Mouse models targeting selenocysteine trna. Expression for elucidating the role of selenoproteins in health and development / B.A. Carlson, M.H. Yoo, P.A. Tsuji [et al.] // *Molecules*. – 2009. – V.14. – P. 3509-3527.

144. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery / M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich [et al.] // *Biomaterials and Nanobiotechnology*. – 2015. – V.6, N. 4. – P. 889–896.
145. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery / M. Liong, J. Lu, M. Kovoichich [et al.] // *ACS Nano*. – 2008. – V. 2, N. 5. – P. 889-896.
146. N-acetylcysteine and glutathione-dependent protective effect of PZ51 (Ebselen) against diquat-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes / I.A. Cotgreave, M.S. Sandy, M. Berggren [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 1987. – V.36. – P. 2899-2904.
147. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy *Nat* / D. Peer, J.M. Karp, S. Hong [et al.] // *Nanotechnol.* – 2007. – V. 2, N. 12. – P. 751-760.
148. Nanocarriers for tuberculosis therapy: design of safe and effective drug delivery strategies to overcome the therapeutic challenges / K. Sarkar, M. Kumar, A. Jha [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2022. – V. 67. – P. 102-850.
149. Nanoceria ameliorates doxorubicin induced cardiotoxicity: possible mitigation via reduction of oxidative stress and inflammation / S. Sangomla, M.A. Saifi, A. Khurana, C. Godugu // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2018. – V. 47. – P. 53-62.
150. Nano-selenium and its nanomedicine applications: A critical review / B. Hosnedlova, M. Kepinska, S. Skalickova [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – V. 13. – P. 2107-2128.
151. Navarro-Alarcon, M. Selenium in food and the human body: a review / M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique // *Science of the Total Environment*. – 2008. – V. 400. – P. 115-141.
152. Nogueira, C. Diphenyl diselenide: a Janus faced compound / C. Nogueira, J. Rocha // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2010. – V. 21. – P. 2055-2071.
153. *Ocimum sanctum* mediated silver nano particles showed better antimicrobial activities compared to citrate stabilized silver nano particles against multidrug

- resistant bacteria / D. Borah, P. Deka, P. Bhattacharjee [et al.] // *Journal of Pharmacy Research*. – 2013. – V. 7, N. 6. – P. 478-482.
154. o-Hydroxymethylphenylchalcogens: synthesis, intramolecular nonbonded chalcogen. OH interactions, and glutathione peroxidase-like activity / S.K. Tripathi, U. Patel, D. Roy [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2005. – V. 70. – P. 9237-9247.
155. Oldfield, J.E. The two faces of selenium / J. E. Oldfield // *Journal of Nutrition*. – 1987. – V.177. – P. 2002-2008.
156. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds / J.J. Chen, L.M. Boylan, C.K. Wu, J.E. Spallholz // *Biofactors*. – 2007. – V. 31. – P. 55-66.
157. Oxidative metabolism of seleno-L-methionine to L-methionine selenoxide by flavin-containing monooxygenases / R.J. Krause, S.C. Glocke, A.R. Sicuri [et al.] // *Chemical Research in Toxicology*. – 2006. – V. 19. – P. 1643-1649.
158. Painter, E.P. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem / E.P. Painter // *Chemical Reviews*. – 1941. – V. 28. – P. 179-213.
159. Pearson, J.K. Effect of substituents on the GPx-like activity of ebselen: steric versus electronic / J. K. Pearson, R.J. Boyd // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2008. – V. 112. – P. 1013-1017.
160. Penatti, C.A. delta-Aminolevulinic acid-induced synaptosomal Ca²⁺ uptake and mitochondrial permeabilization / C.A. Penatti, E.J. Bechara, M. Demasi // *Archives of Biochemistry and Biophysics*– 1996. – V. 335. – P. 53-60.
161. Pinsent, J. The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria / J. Pinsent // *Biochemical Journal*. – 1954. – V. 57. – P. 10-16.
162. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice / F. C. Meotti, V.C. Borges , G. Zeni // *Toxicol Letter*. – 2003. – V. 143. – P. 9-16.

163. Prophylactic activity of biogenic selenium nanoparticles against chronic *Toxoplasma gondii* infection / A. Keyhani, M. Shakibaie, H. Mahmoudvand [et al.] // *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. – 2020. – V. 15, N. 1. – P. 75-84.
164. Protective effect of selenium nanoparticle against cyclophosphamide induced hepatotoxicity and genotoxicity in Swiss albino mice / A. Bhattacharjee, A. Basu, P. Ghosh [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2014. – V. 29, N. 2. – P. 303-317.
165. Rayman, M.P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake / M.P. Rayman // *British Journal of Nutrition*. – 2008. – V. 100. – P. 254-268.
166. Rayman, M.P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake / M.P. Rayman // *British Journal of Nutrition*. – 2008. – V. 100. – P. 254-268.
167. Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is independent of their glutathione peroxidase-like activity: a possible novel pathway for their antioxidant activity / A.S. Freitas, A.S. Prestes, C. Wagner [et al.] // *Molecules*. – 2010. – V. 15. – P. 7699-7714.
168. Recent advances in the mechanism of selenoamino acids toxicity in eukaryotic cells / M. Lazard, M. Dauplais, S. Blanquet, P. Plateau // *Biomolecular Concepts*. – 2017. – V. 8. – P. 93-104.
169. Ren, X.J. A semisynthetic glutathione peroxidase with high catalytic efficiency: selenogluthathione transferase / X.J. Ren, P. Jemth, P.G. Board // *Journal of Biological Chemistry* – 2002. – V. 9. – P. 789-794.
170. Repair of Oxidative DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae* / J. Chalissery, D. Jalal, Z. Al-Natour, A.H. Hassan // *DNA Repair*. – 2017. – V. 51. – P. 2-13.
171. Risk of chronic low-dose selenium overexposure in humans: insights from epidemiology and biochemistry / M. Vinceti, T. Maraldi, M. Bergomi, C. Malagoli // *Reviews on Environmental Health*. – 2009. – V. 24. – P. 231-248.
172. Safety of vitamins and minerals: controversies and perspective / M. G. Soni, T.S. Thurmond, E.R. Miller // *Toxicological Sciences*. – 2010. – V.118. – P. 348-355.

173. Sarma, B.K. Antioxidant activity of the anti-inflammatory compound ebselen: a reversible cyclization pathway via selenenic and seleninic acid intermediates / B.K. Sarma, G. Mugesh // *Chemistry: A European Journal*. – 2008. – V. 14. – P. 10603-10614.
174. Sarma, B.K. Glutathione peroxidase (GPx)-like antioxidant activity of the organoselenium drug ebselen: unexpected complications with thiol exchange reactions / B. K. Sarma, G. J. Mugesh // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – V. 127. – P.11477-11485.
175. Savegnago, L. Structural modifications into diphenyl diselenide molecule do not cause toxicity in mice / L. Savegnago, C.R. Jesse, C.W. Nogueira // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2009. – V. 27. – P. 271-276.
176. Schrauzer, G.N. Interactive effects of selenium and chromium on mammary tumor development and growth in MMTV-infected female mice and their relevance to human cancer / G.N. Schrauzer // *Biological Trace Element Research*. – 2006. – V. 109, N. 3. – P. 281-292.
177. Schuh, B. Selenium intoxication: undesirable effect of a fasting cure / B. Schuh, U. Jappe // *British Journal of Dermatology*. – 2007. – V. 156. – P. 177-178.
178. Schwarz, K. Selenium is an integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration / K. Schwarz, C.M. Foltz // *Journal of the American Chemical Society*. – 1975. – V. 79. – P. 3292-3293.
179. Schwarz, K. Selenium is an integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration / K. Schwarz, C.M. Foltz // *Journal of the American Chemical Society*. – 1957. – V. 79. – P. 3292-3293.
180. Selective targeting of *Mycobacterium smegmatis* with trehalose-functionalized nanoparticles / K.W. Jayawardana, H. S. Jayawardana, S. A. Wijesundera [et al.] // *Journal of the Chemical Communications*. – 2015. – V. 51. – P. 12028-12031.
181. Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase / S. Miller, W. Walker, J. R. Arthur [et al.] // *Clinical Science*. – 2001. – V. 100. – P. 543–550.

182. Selenium - biochemical role as a component of glutathione peroxidase / J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther [et al.] // *Science*. – 1973. – V. 179. – P. 588-590.
183. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems / M. Björnstedt, S. Kumar, L. Björkhem [et al.] // *Biomed Environ Sci*. – 1997. – V. 10. – P. 271-279.
184. Selenium and vitamins status in Saudi children / A. Iman, B. Grisellhi, E. Inaam, E.M. Gamal // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – V. 368. – P. 99-109.
185. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis / M. S. Stewart, J. E. Spallholz, K.H. Neldner, B.C. Pence // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1998. – V. 26. – P. 42-48.
186. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation / Y.G. Zhu, E. Pilon-Smits, F. J. Zhao [et al.] // *Trends Plant Sci*. – 2009. – V. 14. – P. 436-442.
187. Selenium nanoparticles involve HSP-70 and SIRT1 in preventing the progression of type 1 diabetic nephropathy / G. S. Kumar, A. Kulkarni, A. Khurana [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2014. – V. 223. – P. 125-133.
188. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer / J. Brozmanová, D. Mániková, V. Vlčková, M. Chovanec // *Arch Toxicol*. – 2010. – V. 84. – P. 919–938.
189. Stranges, S. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes / S. Stranges, S. Sieri, M. Vinceti // *BMC Pub Health*. – 2010. – V. 10. – P. 564.
190. Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model / V. Diwadkar-Navsariwala, G.S. Prins, S.M. Swanson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103, N. 21. – P. 8179-8184.
191. Selenoprotein gene nomenclature / V.N. Gladyshev, E.S. Arnér, M.J. Berry [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V. 291, N. 46. – P. 24036-24040.
192. Selenoxidation by flavin-containing monooxygenases as a novel pathway for beta-elimination of selenocysteine Se-conjugates / M. Rooseboom, J. Commandeur, G.C. Floor [et al.] // *Chemical Research in Toxicology*. – 2001. – V. 14. – P. 127-134.

193. Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase / M. Farina, V. Folmer, R.C. Bolzan [et al.] // *Tox Let.* – 2001. – V. 119. – P. 27–37.
194. Shiby, E. A facile approach for the ligand free synthesis of biocompatible upconversion nanophosphors / E. Shiby, K.L. Reddy, J. Kumar // *Frontiers in Chemistry.* – 2020. – V. 10. – P. 904676.
195. Singh, N. Effects of metal nanoparticle-mediated treatment on seed quality parameters of different crops / N. Singh, A. Bhuker, J. Jeevanadam // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* – 2021. – V. 394, N. 6. – P. 1-23.
196. Spallholz, J. E. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system / J. E. Spallholz // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 1990. – V. 262. – P. 145-158.
197. Spallholz, J.E. Methioninase and selenomethionine but not S-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids / J.E. Spallholz, V. P. Palace, T.W. Reid // *Biochem Pharmacol.* – 2004. – V. 67. – P. 547- 554.
198. Spallholz, J.E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity / J.E. Spallholz // *Free Rad Biol Med.* – 1994. – V. 17. – P. 45-64.
199. Sperling, R.A. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles / R.A. Sperling, W. Parak // *Philosophical Transactions of the Royal Society.* – 2010. – V. 368. – P. 1333–1383.
200. Starch-templated bio-synthesis of gold nanoflowers for in vitro antimicrobial and anticancer activities / D. Borah, M. Hazarika, P. Tailor [et al.] // *Applied Nanoscience.* – 2018. – V. 8, N. 3. – P. 241-253.
201. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats / E.A. Wilhelm, C.R. Jesse, M.R. Leite, C.W. Nogueira // *Pathophysiology.* – 2009. – V. 16. – P. 31-37.
202. Studies on the antioxidant effect and interaction of diphenyl diselenide and dicholesteroyl diselenide with hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase and

- isoforms of lactate dehydrogenase / I.J. Kade, M.W. Paixao, O.E. Rodrigues [et al.] // *Toxicol In Vitro*. – 2009. – V. 23. – P.14-20.
203. Sun, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticle / Y. Sun, Y. Xia // *Science*. – 2002. – V. 298. – P. 2176-2179.
204. Susceptibility of mice to bacterial and fungal infections after intragastric administration of ebselen / R. Nozawa, M. Arai, R. Kuruto [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1996. – V. 48. – P. 64–67.
205. Synthesis, antioxidant properties, biological activity and molecular modelling of a series of chalcogen analogues of the 5-lipoxygenase inhibitor DuP 654 / L. Engman, D. Stern, H. Frisell [et al.] // *Bioorganic Medicinal Chemistry*. – 1995. – V. 3. – P. 1255-1262.
206. Tapiero, H. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds / H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew // *Biomed Pharmacother*. – 2003. – V. 57. – P.134-144.
207. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model / M.H. Yazdi, M. Mahdavi, E. Faghfuri [et al.] // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2015. – V. 13, N. 2. – P. 1-9.
208. The Effects of Oral Consumption of Selenium Nanoparticles on Chemotactic and Respiratory Burst Activities of Neutrophils in Comparison with Sodium Selenite in Sheep / G.A. Kojouri, S. Sadeghian, A. Mohebbi [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2012. – V. 146. – P. 160-166.
209. The epidemiology of selenium and human cancer / M. Vinceti, S. Rovesti, M. Bergomi, G. Vivoli // *Tumori journal*. – 2000. – V. 86. – P. 105-118.
210. The epidemiology of selenium and human cancer / M. Vinceti, S. Rovesti, M. Bergomi, G. Vivoli // *Tumori*. – 2000. – V. 86. – P. 105-118.
211. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure / C. Chunying, Y. Hongwei, Z. Jiujiang [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. – 2006. – V. 114, N. 2. – P. 297-301.
212. The See Kidney Disease Targeted Screening Program for CKD / L.E. Galbraith, P.E. Ronkly, L.J. Barnieh [et al.] // *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. – 2016. – V. 11. – P. 964-972.

213. The Seleno Bis(S-glutathionyl) Arsinium Ion Is Assembled in Erythrocyte Lysate / M.A. Shawn, G.N. Graham, P.J. Ingrid [et al.] // *Chemical Research in Toxicology*. – 2006. – V. 19, N. 4. – P. 601-607.
214. Thiol peroxidase-activity of diaryl ditellurides as determined by a H-1-NMR Method / L. Engman, D. Stern, I.A. Cotgreave, C.M. Andersson // *Journal of the American Chemical Society*. – 1992. – V. 114. – P. 9737-9743.
215. Towards more efficient glutathione peroxidase mimics: substrate recognition and catalytic group assembly / G.M. Luo, X.J. Ren, J.Q. Liu [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. – 2003. – V. 10. – P. 1151-1183.
216. Toxicological evaluation of subchronic exposure to diphenyl diselenide in rats / F.C. Meotti, V.C. Borges, J. Perottoni, C.W. Nogueira // *Journal of Applied Toxicology*. – 2008. – V. 28. – P. 638-644.
217. Tsen, C.C. Catalytic oxidation of glutathione and other sulfhydryl compounds by selenite / C.C. Tsen, A.L. Tappel // *Journal of Biological Chemistry*. – 1958. – V. 233. – P. 1230-1232.
218. Tsivileva, O. Selenium compounds biotransformed by mushrooms: Not only dietary sources, but also toxicity mediators / O. Tsivileva, A. Perfileva // *Current Nutrition and Food Science*. – 2017. – V. 13, N. 2. – P. 82-96.
219. Turner, R. J. Selenium and the immune response / R. J. Turner, J. M. Finch // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 1991. – V. 50. – P. 275-285.
220. Vahidi, H. Emerging Selenium Nanoparticles to Combat Cancer: a Systematic Review / H. Vahidi, H. Barabadi, M. Saravanan // *Sciencevolume*. – 2020. – V. 31. – P. 301-309.
221. Vallet-Regí, M. Nanomaterials as promising alternative in the infection treatment / M. Vallet-Regí, B. González, I. Izquierdo-Barba // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – P. 3806.
222. Vitamin E and organoselenium prevent the cocarcinogenic activity of arsenite with solar UVR in mouse skin / J. Fang, L. Zhong, R. Zhao, A. Holmgren // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2005. – V. 207. – P. 103-109.

223. Wang, H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice / H. Wang, J. Zhang, H. Yu // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – V. 42. – P. 1524–1533.
224. Wirth, T. Glutathione peroxidase-like activities of oxygen-containing diselenides / T. Wirth // *Molecules*. – 1998. – V. 3. – P.164-166.
225. Wu, Q. The study of the relation between microelement and cytokine in asthma patients / Q. Wu, Z. Baoyu, L. Yang // *Tianjin Yiyao*. – 2004. – V. 32, N. 11. – P. 661-662.
226. Yang, C.F. Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols / C.F. Yang, H.M. Shen, C.N. Ong // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2000. – V. 374. – P. 142-152.
227. Zhao, R. A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase / R. Zhao, A. Holmgren // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – P. 39456-39462.
228. Zwolak, I. The role of selenium in arsenic and cadmium toxicity: An updated review of scientific literature / I. Zwolak // *Biological Trace Element Research*. – 2020. – V. 193. – P. 44-63.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2760685

Композиция для инъекционного применения на основе фосфотидилхолина, метионина, витамина Е и селенита натрия - "Гепарс", обладающая гепатопротекторными свойствами, и способ ее получения

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова" (RU)*

Авторы: *Древко Ярослав Борисович (RU), Ларионова Ольга Сергеевна (RU), Осипова Мария Вячеславовна (RU), Горшунцова Софья Владимировна (RU), Древко Борис Иванович (RU), Козлов Сергей Васильевич (RU), Ларионов Сергей Васильевич (RU)*

Заявка № **2020143108**

Приоритет изобретения **25 декабря 2020 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **29 ноября 2021 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **25 декабря 2040 г.**

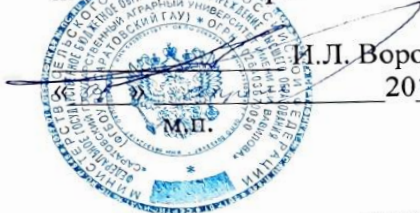


*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 0x02A95CF8C32B13DF594A4A2F080925A118
Владелец **Ильяс Григорий Петрович**
Действителен с 15.01.2021 по 15.01.2035

Г.П. Ивлиев

Согласовано

И.о. проректора по научной и
инновационной работе

И.Л. Воротников

2021 г.

Утверждаю

 Директор ФГУП "Учебно-
опытное хозяйство Муммовское"
РГАУ-МСХА имени К.А.
Тимирязева"


Д.В. Ворников

« 06 » _____ 2021 г.

М.П.

АКТ

о внедрении НИОКР в производство

Мы, нижеподписавшиеся, представители ФГБОУ ВО Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова – заведующий кафедрой «Микробиология, биотехнология и химия», д-р биол. наук Ларионова О.С.; доцент, канд. хим. наук Древо Я.Б.; ассистент Горшунова С.В. с одной стороны и представитель потребителя научно-технической продукции (далее НТП) директор ФГУП "Учебно-опытное хозяйство "Муммовское" РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева" (Саратовская область, Аткарский район, д. Ершовка, ул. Центральная, д. 1А.) Д.В. Ворников с другой стороны, составили настоящий акт в том, что НТП – препарат для восполнения дефицита микроэлемента селена на основе наночастиц селена соответствует современному уровню достижений науки и техники и принят к практическому использованию на вышеназванном предприятии.

Данная технология представляет собой комплексный препарат на основе наночастиц селена, стабилизированных поливинилпирролидоном. Предназначен для восполнения дефицита микроэлемента селена. Обладает выраженным иммуностимулирующим действием, не вызывает аллергических реакций.

Представители СГАУ

Ларионова О.С.

Древо Я.Б.

Горшунова С.В.

Представитель
потребителя НТП

Д.В. Ворников