

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

На правах рукописи



ПХИЪО МЪИНТ У

**Антиоксидантные свойства растительных и микробных
препаратов и их практическое применение**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора химических наук

Научный консультант:

д.т.н., профессор Виктор Иванович

Панфилов

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1: ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	18
1.1 Сведения об антиоксидантных свойствах различных препаратов	18
1.1.1 Свободно-радикальные реакции окисления биологически-активных веществ и их биологическое действие.....	24
1.1.2 Методы исследования реакционной способности полифенольных веществ	32
1.1.3 Окислительный стресс и влияние препаратов растительного и микробного происхождения на стресс-ответ у микроорганизмов в присутствии и отсутствии кислорода.....	34
1.1.4 Антиоксидантные свойства рутина как соединения фенольной природы	41
1.2 Радиолит различных биологически-активных веществ и других химических препаратов.....	43
1.2.1 Радиационно-химические превращения фенольных соединений....	44
1.2.2 Радиолит фенола и пространственно-затрудненного фенола (2,6 – ди-трет-бутил-4-метилфенол).....	54
1.2.3 Взаимодействие 2,6 –ди-трет-бутил-4-метилфенол(ионол) с АКМ	58
1.3 Дрожжи как объекты исследования.....	63
1.3.1 Строение, биохимические и молекулярно-биологические особенности дрожжей	64
1.3.2 Механизм защиты от АФК дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i>	65
1.4 Влияние различных стресс-факторов на дрожжевые клетки	69
1.4.1 Места и пути образования свободных радикалов.....	70

1.4.2 Системы защиты от окислительного стресса в клетке и антиоксидантная система у дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	72
1.4.3 Ионизирующее излучение и его биологическое действие на микроорганизмы	76
1.4.4 Взаимосвязь ионизирующего излучения и окислительного стресса	78
1.4.5 Области применения в промышленности адаптированных линий..	79
1.4.6 Действие рентгеновского излучения на дрожжи р. <i>Saccharomyces</i> .	80
1.4.7 Процессы восстановления в облученном микроорганизме и репарация ДНК	83
1.4.8 Влияние стрессовых воздействий: этанола, H ₂ O ₂ и различных химических добавок (амины, нафталин и другие) на выживаемость дрожжевых клеток.....	85
1.5 «Зелёный» и радиационно-химический синтез наночастиц серебра и селена	91
1.6 Влияние ионов серебра и селена на выживаемость дрожжей	99
рода <i>Saccharomyces</i>	99
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	103
2.1 Исходные реактивы и их квалификация	103
2.1.1 Приготовление экстрактов донника, багульника, муррайи, лабазника и каркаде	104
2.1.2 Приготовление кумаринов	104
2.2 Применяемые методики анализа.....	105
2.2.1 Методика выделения кумарина из донника и багульника.....	105
2.2.2 Методика определения кумарина в доннике хроматографическим методом	106
2.2.3. Методика определения антирадикальных свойств экстрактов растений и кумаринов по их реакционной способности взаимодействовать со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	106

2.2.4	Методика определения реакционной способности кумаринов по отношению к супероксид-анион радикалу	108
2.2.5	Методика проведения реакции образования гидразона ацетальдегида	110
2.3	Получение культур дрожжей, устойчивых к воздействию высоких концентраций пероксида водорода	111
2.3.1	Проверка устойчивости дрожжей с помощью культивирования на чашках Петри с внесенным в среду пероксидом водорода	112
2.4	Культивирование дрожжей <i>S. cerevisiae</i> в присутствии и отсутствии различных добавок	113
2.5	Культивирование дрожжей <i>S. cerevisiae</i> с добавлением 40% и 70% этанола, инола с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 37% пероксида водорода	114
2.6	Методика количественной оценки числа микроорганизмов методом Коха	115
2.7	Сведения об использовании 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида при исследовании антиоксидантных свойств	117
2.8	Приготовление раствора рутина для анализа его антирадикальной активности в реакции с ДФПГ	119
2.9	Приготовление раствора нитрата серебра с добавлением экстрактов растений	120
2.10	Приготовление экстрактов лекарственного растения багульника болотного в присутствии и в отсутствие ионов серебра и селена	120
2.11	Йодометрия в определении пероксида водорода	121
2.12	Методы исследования антирадикальной активности и радиопротекторных свойств фенольных систем	122
2.12.1	Метод спектрофотометрии	122

2.12.2	Метод оптической микроскопии	123
2.12.3	Метод хроматографии	124
2.12.4	Метод хромато-масс исследований.....	127
2.12.5	Метод флуориметрии.....	130
2.13	Облучение. Дозиметрия	131
2.13.1	Установка для стационарного радиолиза РХМ-γ-20	131
2.13.2	Рентгеновское облучение	133
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ РЕАКЦИОННО-АКТИВНЫХ ХИМИЧЕСКИХ		
ВЕЩЕСТВ И ЭКСТРАКТОВ ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С		
ИССЛЕДОВАНИЕМ ИХ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ И		
РАДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ.....		
		136
3.1	Спектрофотометрическое исследование экстрактов лекарственных	
	растений и различных антиоксидантов	136
3.1.1	Спектрофотометрическое исследование исходных экстрактов	
	донника, багульника, муррайи в различных растворителях.....	137
3.1.2.	Спектрофотометрические исследования изменений в экстрактах	
	донника, багульника, муррайи в различных растворителях после	
	воздействия ионизирующего излучения.....	146
3.1.3	Исследования изменений в составе экстрактов донника и багульника	
	в 40% растворе этанола.....	149
3.1.4	Исследования радиационно-химических превращений ионола в	
	этаноле под действием рентгенолучей.....	152
3.1.5	Спектрофотометрическое исследование свободно-радикальных	
	реакций рутина	157
3.1.6	Спектрофотометрическая оценка получения наночастиц серебра с	
	использованием раствора нитрата серебра с добавлением экстрактов	
	лекарственных растений (багульника болотного, каркаде и муррайи)..	165
3.1.7	Изменение спектров оптического поглощения экстракта багульника	
	болотного в присутствии и в отсутствие ионов серебра и селена	171

3.1.8	Определение размера и дзета-потенциала наночастиц	178
3.2	Исследование спектров флуоресценции экстрактов донника и багульника	182
3.3	Хроматографическое исследование кумаринов и экстрактов донника, багульника и муррайи	184
3.3.1	Газо-жидкостная хроматография экстракта донника.....	184
3.3.2	Определение концентрации кумарина в водно-этанольных экстрактах донника после воздействия ионизирующего излучения	186
3.4	Определение антирадикальных свойств водно-этанольных экстрактов и некоторых кумаринов 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом после воздействия ионизирующего излучения	199
3.4.1	Реакционная способность водно-этанольных экстрактов багульника, и донника в реакции с 2,2- дифенил-1-пикрилгидрозилом	202
3.4.2	Реакционная способность водно-этанольных экстрактов муррайи в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	210
3.4.3	Реакционная способность некоторых кумаринов в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом.....	216
3.5	Определение радиопротекторной активности багульника и донника .	218
ГЛАВА 4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК <i>S. CEREVISIAE</i> T-985 И <i>S. CARLSBERGENSIS</i> В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.....		220
4.1	Дрожжи как модельная система для оценки радиопротекторных свойств	220
4.1.1	Получение устойчивых к пероксиду водорода культур микроорганизмов.....	220
4.1.2	Проверка устойчивости клеток, высеянных на чашках Петри	223
4.1.3	Определение содержания общего белка в биомассе методом Кьельдаля	224
4.1.4	Определение содержания нуклеиновых кислот методом Спирина.....	227

4.1.5	Изучение влияния ионизирующего облучения на выживаемость клеток.....	229
4.1.6	Влияние дневного света на дрожжи <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i> 232	
4.1.7	Исследование влияния активных форм кислорода (H_2O_2) на выживаемость дрожжей после облучения.....	249
4.1.8	Влияние оксидативного стресса на дрожжи <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i>	256
4.1.9	Влияние этанола на дрожжи <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i>	257
4.2	Исследование влияния различных химических факторов на дрожжи <i>Saccharomyces</i>	261
4.2.1	Влияние нафталина и 2,3-диаминонафталина на выживаемость дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i> до и после облучения.....	261
4.2.2	Влияние внесения нафталина и 2,3-диаминонафталина в присутствии АФК (H_2O_2) на выживаемость дрожжей до и после облучения.....	270
4.2.3	Исследование влияния антиоксидантных свойств экстрактов донника, багульника и лабазника на клетки дрожжей.....	278
4.3.	Влияние рутина и ионола на выживаемость дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i>	288
4.3.1	Влияние рутина с концентрацией (10^{-4} моль/л) и (10^{-5} моль/л) в 40% растворе этанола на выживаемость дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i>	290
4.3.2	Влияние раствора ионола на выживаемость дрожжей до и после облучения	309
4.3.3	Влияние рутина с концентрацией (10^{-4} моль/л) и (10^{-5} моль/л) в 70% растворе этанола на выживаемость дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i> в присутствии перекиси водорода.....	318

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И СЕРЕБРА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ

ИЗУЧАЕМЫХ ЭКСТРАКТОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОДЕЛЬНЫМИ БИООБЪЕКТАМИ	322
5.1 Влияние экстрактов лекарственных растений в присутствии наночастиц серебра на выживаемость клеток <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. carlsbergensis</i> 323	
5.1.1 Влияние наночастиц серебра с концентрациями (10^{-3} и 10^{-4} М) на выживаемость клеток <i>S. cerevisiae</i> после облучения.....	323
5.1.2 Влияние наночастиц серебра на выживаемость клеток <i>S. cerevisiae</i> после облучения в присутствии растительных экстрактов	332
5.2 Влияние наночастиц селена на выживаемость клеток <i>S. cerevisiae</i> после облучения.....	336
5.2.1 Влияние пероксида водорода в присутствии наночастиц селена на выживаемость клеток дрожжей	339
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	343
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	346
ПРИЛОЖЕНИЕ	374

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА	– Ацетальдегид
АКМ	– Активные кислородные метаболиты.
АО	– Антиоксидант
АТФ	– Аденозинтрифосфат
АФА	– Активная форма азота
АФК	– Активная форма кислорода
АФС	– Активная форма серы
АЭС	– Атомные электростанции
БАВ	– Биологически активные вещества
БАД	– Биологически активная добавка
БД	– Бутандиол-2,3
ВНТ	– 2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол
ВЭЖХ	– Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ	– Газожидкостная хроматография
ГПД	– Глутатионпероксидазы
ГХ	– Газовая хроматография
ГЭР	– Альфа-гидроксиэтильный радикал
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНФГ	– 2,4-динитрофенилгидразон
ДФПГ	– 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозил
ИИ	– Ионизирующее излучение
КОЕ	– Колониеобразующая единица
МДА	– Малоновый диальдегид
НК	– Нуклеиновая кислота
НЧ	– Наночастица
ПАА	– Первичные ароматические амины
ПВ	– Пострадиационное восстановление
ПИД	– Пламенно-ионизационный детектор

ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
РНК	– Рибонуклеиновая кислота
СОАР	– Супероксид анион радикал
СОД	– Супероксиддисмутаза
ТДА	– Толуолдиамины
УФ	– Ультрафиолетовый
УФА	– Ультрафиолетовое Альфа-излучение
УФБ	– Ультрафиолетовое Бета- излучение
ФЛГПД	– Фосфолипид-гидропероксидных ГПД
ФПЛ	– Фермент первой линии
Э.б.б	– Экстракт багульника болотного
ЭПР	– Электронный парамагнитный резонанс
AgNPs	– Наночастицы серебра
CRISPR	– Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
FISH	– Fluorescence In Situ Hybridization
HSPs	– Синтез белков теплового шока
iNOS	– Индуцируемая синтаза оксида азота
NBT	– Нитросиняя тетразолия хлорида
OD	– Оптическая плотность
SeNPs	– Наночастицы селена
TQD	– Интерфейс тандемного квадруполья

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. По статистике Всемирной организации здравоохранения окислительный стресс является причиной более 80% неинфекционных заболеваний от сердечно-сосудистых до онкологических и нейродегенеративных. Известно, что увеличение попадания в окружающую среду и в организм человека реакционно-активных веществ способно инициировать образование окислительного стресса за счет свободных радикалов, это создает необходимость выяснения механизмов воздействия таких веществ и продуктов их реакций на модельные биологические системы и использование результатов в практических целях.

Известно, что растительные и микробиологические препараты обладают мощным антиоксидантным действием, превосходя синтетические аналоги по биодоступности и экологичности. Поэтому в настоящее время широко изучаются природные растительные вещества с антиоксидантным потенциалом, которые инактивируют радикалы и снижают их токсичность. Однако, несмотря на известные антиоксидантные свойства кумаринов и флавоноидов, их радиопротекторный потенциал, особенно в комплексе с наночастицами и в составе сложных экстрактов с использованием клеточной модели изучен недостаточно.

Воздействие ионизирующих излучений на биологические объекты является темой широкомасштабных исследований, в которых изучается как непосредственное воздействие на биообъекты на разных уровнях их организации, так и отложенные последствия облучения. Все виды ионизирующего излучения приводят к широкому спектру биологических изменений, затрагивая биохимические и молекулярно-биологические аспекты функционирования клеток. Репрезентативными объектами для изучения воздействия ионизирующего облучения и других стрессовых воздействий считаются клетки микроорганизмов-эукариот. Дрожжи рода *Saccharomyces* являются именно такими хорошо изученными модельными организмами, и в настоящей работе они используются для изучения протекторных эффектов

различных препаратов природного происхождения при воздействии ионизирующего излучения и других стрессоров.

Цель работы – выявление и оценка антиоксидантной и радиопротекторной активности растительных экстрактов и индивидуальных соединений кумаринового ряда в условиях окислительного стресса, индуцированного ионизирующим излучением с использованием клеток дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы.

Задачи исследования:

- Определение антиоксидантной и антирадикальной активности растительных экстрактов лекарственных растений, а также отдельных реагентов при воздействии ионизирующего излучения и других индукторов окислительного стресса.
- Оценка радиопротекторной активности водных растворов кумаринов, выделенных из экстрактов донника, лабазника и багульника.
- Применение дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как тест-систем для выявления и оценки потенциальных радиопротекторов среди полученных экстрактов.
- Проверка возможности адаптации дрожжей *S. cerevisiae* к пероксиду водорода.
- Оценка влияния видимого освещения облучаемого биологического материала на повреждающее и стерилизующее действие ионизирующего излучения.
- Оценка влияния различных химических реагентов на выживаемость дрожжей р. *Saccharomyces* до и после облучения.
- Анализ перекрестных ответных реакций микроорганизмов на стрессы, индуцированные рентгеновским облучением и действием активных форм кислорода.

- Оценка влияния биосинтезированных наночастиц серебра и селена на основе растительных экстрактов на жизнеспособность *S. cerevisiae* до и после рентгеновского облучения.

Объекты исследований – экстракты природных лекарственных растений: багульника болотного (*Ledum palustre*), донника лекарственного (*Melilotus officinalis*), муррайи метельчатой (*Murraya paniculata*), каркаде (*Hibiscus sabdariffa*) и лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria*), синтетические фенольные соединения (кумарин, ионол, дигидрокумарин, эскулетин, эскулин, скополетин, умбеллиферон), наночастицы селена и серебра, а также микроорганизмы – дрожжи р. *Saccharomyces*.

Предмет исследований – антиоксидантная и радиопротекторная активности растительных и микробных препаратов, а также особенности их воздействия на биологические объекты с использованием клеток дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы для последующего применения в медицине, пищевой промышленности и агропромышленном комплексе.

Методология и методы исследований – в основе исследований лежат современные представления о механизмах окислительного стресса, антиоксидантной защите организма и роли природных (растительных и микробных) соединений в нейтрализации свободных радикалов. Подход основан на системном и комплексном анализе биохимических, физиологических и фармакологических свойств природных препаратов, а также на принципах доказательной медицины и биотехнологии. Исследования проводили на базе РХТУ им. Д.И. Менделеева с применением спектрофотометрических, хроматографических, хромато-масс-спектрометрических методов, оптической микроскопии, а также с использованием рентгеновской установки и ряда других экспериментальных установок. Аналитические методики, используемые в работе, соответствуют

требованиям государственных стандартов Российской Федерации (ГОСТ).

Научная новизна полученных результатов заключается в следующих положениях:

- Предложена и научно обоснована методика тестирования растительных экстрактов и соединений кумаринового ряда на предмет выявления антиоксидантной активности с использованием клеток дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы.

- Предложен способ повышения радиационной устойчивости дрожжей-сахаромицетов (*Saccharomyces cerevisiae*) к воздействию ионизирующего излучения на который получено «ноу-хау». Способ заключается в предварительной обработке клеток дрожжей биологически активным веществом рутином (витамином Р) в определенной концентрации (0,05 мМ в 40 % и 70% растворе этанола) до и после облучения (0 Гр, 400 Гр, 800, 2000 Гр). Обработка рутином, обладающим выраженными антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами, позволяет значительно снизить оксидативный стресс, индуцированный радиацией, и повысить выживаемость клеточной популяции.

- Показано, что при введении ионола с концентрациями 0.5 мМ и 0.05 мМ выживаемость клеток дрожжей *S. cerevisiae* увеличивается почти в 3 раза. Спустя 24 часа после облучения добавление ионола к дрожжам привело к двукратному увеличению выживаемости дрожжей по сравнению с контролем.

- Установлено, что нафталин также проявляет радиозащитное действие в отношении дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*, особенно после внесения пероксида водорода, что подтверждено снижением доли мертвых клеток *S. cerevisiae*. Защитное действие нафталина, возможно, обусловлено его антиоксидантным действием в условиях окислительного стресса, развивающегося в результате перекрестных реакций в ответе клеток дрожжей на действие рентгеновского излучения.

- Установлено, что рутин стабилизирует антирадикальную активность

после облучения (ингибирование ДФПГ – 67–86%), а доля мертвых клеток дрожжей составляет 8-12% в зависимости от дозы облучения. Оптимальная защита достигается при концентрации рутина 0,05 мМ в 70% растворе этанола.

- Доказано, что свежеприготовленные водно-спиртовые экстракты лекарственных растений: багульника болотного, донника лекарственного, муррайи метельчатой, каркаде и лабазника вязолистного обладают повышенным антиоксидантным и радиопротекторным действием в отношении дрожжевых клеток сахаромецетов. Присутствие наночастиц серебра, полученных методом «зеленого» синтеза, вызывает токсическое действие на дрожжевые клетки как до, так и после воздействия рентгеновского излучения.

- Показана корреляция между химической структурой соединений и их способностью защищать клетки от оксидативного стресса, вызванного радиацией.

- Впервые установлено, что совместное действие экстракта багульника с наночастицами селена приводит к росту антиоксидантных свойств, увеличивая количество живых клеток дрожжей после облучения, что указывает на возможность использования данной системы, как радиопротекторного препарата.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе выполнения работы решены актуальные проблемы, связанные с радиационной защитой, антиоксидантной терапией и использованием природных и химических соединений для повышения устойчивости биологических систем к стрессовым факторам:

- предложены механизмы радиационного повреждения и восстановления клеток, помогающие углубить фундаментальные знания о взаимодействии физических, химических и биологических факторов;

- оценка антирадикальной активности веществ и экстрактов растений позволяет лучше понять механизмы нейтрализации активных форм кислорода

(АФК) и свободных радикалов. Полученные знания могут быть применены для профилактики и лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом, таких как онкологические, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания;

- экспериментально доказано, что использование дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* как модельных организмов позволяет быстро и эффективно изучать механизмы повреждения и восстановления клеток после радиационного воздействия, а также тестировать эффективность новых защитных веществ;

- применение рутина позволяет значительно повысить выживаемость дрожжевых клеток в широком диапазоне летальных доз облучения;

- показано, что такие растения, как багульник болотный, донник лекарственный, муррайя метельчатая и лабазник, могут стать источниками экологически чистых, доступных и эффективных антиоксидантов и радиопротекторов;

- доказано, что экстракт багульника обладает высокими антиоксидантными свойствами благодаря содержанию биологически активных веществ, а образование наночастиц селена значительно усиливает антиоксидантную активность, подавляя образование пероксида водорода.

Результаты экспериментов демонстрируют перспективность использования наночастиц селена для повышения биодоступности и эффективности природных радиопротекторов, что может быть полезно для разработки новых средств защиты от ионизирующего облучения.

Результаты работы могут быть использованы для поиска и разработки новых препаратов на основе растительных экстрактов и химических соединений, которые будут способны эффективно защищать клетки от радиационного повреждения и нейтрализовать воздействие АФК. Это будет способствовать развитию технологий использования местных природных ресурсов для пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности Республики Союз Мьянма.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований по реакционной способности различных добавок (кумарины, нафталин, ионол, рутин) и полученных водно-этанольных экстрактов лекарственных растений в реакциях со свободными радикалами (гидроксиэтильный углеродцентрированный радикал,ДФПГ, супероксидный анион-радикал и другие).

2. Антирадикальная активность водно-этанольных экстрактов донника, багульника, муррайи по отношению к гидроксиэтильному углеродцентрированному радикалу связана с наличием кумаринов в их составе, которую можно оценить по изменению концентрации ацетальдегида.

3. Методика тестирования растительных экстрактов и соединений кумаринового ряда на предмет выявления антиоксидантной активности с использованием клеток дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы.

4. Оценка радиационной чувствительности дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* при внесении АФК, этанола, нафталина, ионола, рутина, а также наночастиц серебра и селена.

5. Оценка жизнеспособности дрожжевых клеток *Saccharomyces* при внесении антиоксидантов растительного происхождения экстрактов растений до и после облучения.

Достоверность научных положений и выводов подтверждена высоким методическим уровнем проведения работы, соответствующим объемом экспериментальных данных с использованием современных физико-химических и микробиологических методов исследования с применением современного оборудования, имеющегося в Центре коллективного пользования и на кафедрах РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также статистической обработкой полученных данных и их согласованностью с данными в научной литературе.

Апробация работы. Результаты диссертации представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на: VII Всероссийском симпозиуме и Школе- конференции молодых учёных «Кинетика и динамика обменных процессов» (2018, г. Сочи); Международной научно-практической конференции «Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность» (2019, 2020, 2021, 2022, 2023, г. Севастополь); Успехи в химии и химической технологии, МКХТ (2019, 2020, 2024, г. Москва), VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (2020, г. Ялта), VI Международной научной конференции УГНТУ в (2021, г. Уфа), Всероссийской конференции с международным участием «Проблемы и Инновационные Решения в Химической Технологии ПИРХТ-2022» (2022, г. Воронеж), International Russian Conference on Ecology and Environmental Engineering (RusEcoCon) (2022, 2023, 2025, г. Сочи), II Всероссийской научно-практической конференции студентов, магистрантов, аспирантов «Современные достижения молодых ученых в биологии, медицине и ветеринарии» (2023, г. Астрахань), XII Международной научной конференции молодых учёных: Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения (2024, г. Москва).

ГЛАВА 1: ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Сведения об антиоксидантных свойствах различных препаратов

В ходе исследования растительных препаратов было обнаружено, что их применение может способствовать повышению радиорезистентности животных, подвергнутых облучению. В ходе исследования, проведенного А. Такеда и др. было обнаружено, что внутривенное введение экстракта корня женьшеня мышам, подвергшихся сублетальному облучению, способствует быстрому восстановлению клеточного состава костного мозга, нормализации массы селезенки и увеличению выживаемости животных до 80%. Проведенные эксперименты с экстрактом из корней растения элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus*), другого представителя этого семейства, показали, что он способен увеличить выживаемость облученных мышей на фоне активной стимуляции лейкопоза. Известно, что препараты этого ряда являются эффективными адаптогенами и могут успешно применяться для лечения отдаленных последствий радиационного воздействия, особенно в случаях, особенно в случаях, сопровождающихся астеническими проявлениями [1].

Также 30 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС прошли курс лечения антиоксидантами из листьев гинкго двулопастного. Экстракт растения, содержащий флавоноиды и терпеноиды, назначали в суточной дозе 120 мг в течение 2 месяцев. Кластогенная активность плазмы снижалась до контрольного уровня в первые сутки после окончания лечения. Последующее наблюдение в течение 1 года показало, что польза от лечения сохраняется не менее 7 месяцев [2].

В ходе экспериментов на мышах, подвергнутых облучению, был отмечен положительный эффект водного экстракта гудучи (*Tinospora cordifolia*). Пероральное введение в дозе 10 мг/кг массы тела мышам-альбиносам за 7 дней до облучения всего тела (8 Гр) обеспечивало

значительную защиту с точки зрения процента выживаемости. Не было летальности до 13-го дня, а 50% животных дожили до 30-го дня. У мышей, подвергшихся облучению (8 Гр) без предварительного введения экстракта, 100 % смертность составила до 14 дней [3].

Также были обнаружены избирательные радиопротекторные свойства лекарственных растений. Базилик священный (*Ocimum sanctum Linn.*), содержащий флавоноиды, ориентин и виценин, способен избирательно защищать нормальные ткани от ионизирующего излучения, тогда как влияние на опухолевые клетки оказано не было. Исследования проводились на мышах, привитых опухолью, доза водного экстракта базилика 50 мг/кг, γ -облучение 10 Гр. Было показано, что предварительное введение экстракта перед облучением не влияет на радиационно-индуцированное уничтожение и регрессию опухолевых клеток. Данное исследование имеет огромное значение, т. к. дополнительная защита здоровых клеток позволит использовать более высокие дозы излучения для лучшего воздействия на опухолевые клетки. Помимо этого, введение экстракта базилика позволит снизить негативное влияние облучения на нормальные клетки, тем самым уменьшая побочные эффекты, которые могут возникнуть при радиационной терапии. Это особенно важно для сохранения функциональности органов и тканей, которые могут быть подвержены облучению в процессе лечения [3]. Лекарственное растение подофилл шеститычинковый (*Podophyllum hexandrum*), как сообщается [4], защищает желудочно-кишечного тракт и нервную систему от повреждений, вызванных ионизирующим излучением. Введение мышам экстракта 30 мг/кг за 30 минут до облучения обеспечила 82% смертность на 30 сут. Доза облучения составила 10 Гр, 100 % смертность мышей без введения экстракта составила 7 дней. Было доказано подавление генерации свободных радикалов, при концентрации 0,2 мг/мл было достигнуто около 90% ингибирования и максимальное ингибирование 97% при концентрации 2 мг/мл [4]. Авторы предполагают, что радиопротекцию обеспечивают антиоксидантные соединения, содержащиеся в экстракте подофиллы шеститычинковой, такие

как витамины А, С, Е, К, дубильные вещества и флаваноиды. Растение также содержит микроэлементы, такие как Se, Zn и Cu, которые являются частью металлоферментов и, как известно, проявляют антиоксидантную активность и радиопротекцию [10].

Радиопротекторные свойства обнаружены и у лекарственного растения женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng*). Авторы выявили ингибирование перекисного окисления липидов в течение длительного времени. Также было обнаружено, что введение экстракта женьшеня защищает стволовые клетки костного мозга. В исследованиях культивируемых лимфоцитов селезенки мышей было показано, что применение водного экстракта за 48 часов до γ -облучения (5 Гр) снижает частоту двунитевых разрывов ДНК [5].

Таким образом, анализ литературных источников показывает, что растительные экстракты могут действовать как антиоксиданты, защищая клетки от окислительного стресса, который может быть вызван ионизирующим излучением. Кроме того, они могут обладать противовоспалительными свойствами, способствовать регуляции иммунной системы и стимулировать регенерацию тканей, что способствует восстановлению организма после воздействия радиации. Поэтому препараты растительного происхождения могут быть использованы как потенциальные радиопротекторные средства [4].

Биологически активные вещества, содержащиеся в растениях, делятся на растительные вещества первичного синтеза: белки, углеводы, ферменты, липиды, витамины, и продукты вторичного метаболизма: органические кислоты, фенольные соединения, терпеноиды и т.д. Однако, такое деление в определенной мере условно [4].

В медицине вещества вторичного биосинтеза называют обычно биологически активными веществами или соединениями, а иногда – физиологически активными соединениями [4, 6].

Строгой классификации БАВ нет до настоящего времени. Ученые насчитывают до 20 групп различных БАВ. Наиболее часто встречаются в

растениях такие группы, как алкалоиды, гликозиды, фенольные соединения, терпеноиды, полисахариды, жирные масла, органические кислоты, витамины (единственная группа соединений первичного биосинтеза), микроэлементы.

Качественный состав и количественное содержание этих веществ зависит от условий произрастания растений, фазы их развития, времени сбора, способа сушки, хранения сырья и других факторов [2, 4].

Биологическая активность лекарственных растений обусловлена разнообразием взаимодействий между активными компонентами и биологическими системами организма человека. Некоторые активные соединения растений могут связываться с определенными рецепторами клеток. Это взаимодействие может активировать или подавлять определенные сигнальные пути, что приводит к изменениям в клеточной функции. Также биологически соединения могут влиять на активность ферментов в организме. Это может привести к изменениям в метаболизме, обмене веществ и других биохимических процессах. Помимо этого, многие лекарственные растения содержат вещества, которые обладают противовоспалительными свойствами. Они могут подавлять активность воспалительных медиаторов или регулировать активность иммунной системы. Также биологической активностью обладают антиоксидантные соединения лекарственных растений, которые способны защищать клетки организма человека от повреждений, вызванных образованием свободных радикалов. При этом, определённые соединения растений обладают свойствами, которые могут подавлять бактерии или вирусы.

Компоненты, содержащиеся в растениях, включая алкалоиды, флавоноиды, терпеноиды, гликозиды и другие органические соединения, играют важную роль в определении их фармакологических свойств. Каждый компонент растения может оказывать влияние на организм человека, вызывая определенные биологические эффекты. Биологическая активность лекарственных растений зависит от нескольких факторов, включая концентрацию и соотношение активных компонентов, их взаимодействие с

рецепторами в организме, метаболические пути воздействия соединений, а также физико-химические свойства компонентов. Важно отметить, что взаимодействие между компонентами растений может быть синергическим или антагонистическим, что может влиять на их общую биологическую активность [1]. Кроме того, эффекты могут изменяться в зависимости от способа приготовления и применения лекарственных средств, которые могут быть использованы как отвары, настои, экстракты или в виде отдельных соединений.

Негативные последствия, вызванные ионизирующим излучением, в биологических системах посредством генерации активных форм кислорода играют решающую роль в поддержании метаболического гомеостаза в организме, и, следовательно, любое несоответствие в гомеостазе приводит к окислительному стрессу, который может быть преодолен дополнительным обеспечением природных антиоксидантов растительного происхождения. Экстракты ароматических растений содержат соединения, такие как флавоноиды, терпены, дубильные вещества, стильбены, лигнаны и витамины [3].

Фенольные соединения являются вторичными метаболитами растений и участвуют в защите от ультрафиолетового излучения и воздействий патогенов. Данные соединения обычно имеют одно или несколько ароматических колец, которые действуют как расширенная сопряженная ароматическая система для делокализации неспаренного электрона и одной или нескольких гидроксильных групп, которые отдают атом водорода или электрон свободному радикалу. Таким образом, эти фитоконпоненты имеют подходящую структуру для подавления свободных радикалов [6].

Полифенолы также действуют как восстановители, антиоксиданты, донорствующие водород, синглетные гасители кислорода и хелаторы металлов, тем самым придавая им присущую им антиоксидантную активность. С другой стороны, флавоноиды препятствуют реакциям распространения свободных радикалов и образованию радикалов путем хелатирования

переходного металла. α -токоферол, один из самых известных витаминов, обеспечивает защиту внутриклеточных мембран главным образом путем гашения синглетного кислорода и реакции с липидными пероксидными радикалами, что, следовательно, приводит к отмене уровней перекисного окисления липидов [3].

Алкалоиды могут воздействовать на сердечно-сосудистую систему. Они оказывают положительное влияние на сердечную деятельность, усиливают сократительную функцию сердца и улучшают кровоснабжение органов. Также алкалоиды воздействуют на центральную нервную систему.

Некоторые терпеноиды обладают антимикробной активностью и могут помогать в борьбе с инфекциями. Например, тимол, содержащийся в тимьяне и душице, имеет антимикробные свойства и может быть использован в качестве природного антисептика. Также терпеноиды, содержащиеся в растениях, таких как багульник, имбирь и эвкалипт, могут обладать противовоспалительными и противомикробными свойствами [4].

Кверцетин содержащийся в багульнике болотном – это один из наиболее известных флавоноидов, обладающий выраженным антиоксидантным действием. Кверцетин обладает противовоспалительными свойствами. Он может снижать уровень воспалительных медиаторов в организме, таких как цитокины и хемокины, и помогать смягчить воспаление. Это делает кверцетин полезным для снижения воспаления хронических заболеваний, таких как артрит, астма и некоторые сердечно-сосудистые заболевания. Также он способствует снижению уровня холестерина, особенно "плохого" LDL-холестерина, что помогает снизить риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, кверцетин способствует расширению кровеносных сосудов, улучшает кровообращение и может снижать кровяное давление [6].

Дубильные вещества применяют как вяжущие, противовоспалительные и бактерицидные средства. Также дубильные вещества могут улучшать пищеварение и помогать восстановлению после

тяжелых заболеваний.

Багульник болотный содержит витамин С, который является сильным антиоксидантом и помогает защищать клетки от повреждений свободными радикалами. Также в нем присутствуют витамины группы В, такие как тиамин (В₁), рибофлавин (В₂) и ниацин (В₃), которые необходимы для правильного функционирования нервной системы, обмена веществ и производства энергии в организме. Кроме того, багульник болотный содержит витамин К, который играет важную роль в крови свертывании и помогает поддерживать здоровье костей.

Кроме того, багульник болотный содержит кумарины - соединения, которые обладают антикоагулянтным действием. Эти соединения могут помочь предотвратить образование тромбов и улучшить кровообращение в организме. Кумарины также имеют противовоспалительное действие и оказывают противоопухолевое действие [6].

Современные методы анализа, такие как газовая и жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс, позволяют идентифицировать и количественно определять биологически активные соединения в лекарственных растениях. Это позволяет установить связь между химическим составом и биологической активностью растений, а также контролировать качество и стандартизацию лекарственных препаратов на основе растений. Исследования в этой области также включают изучение различных видов лекарственных растений и различие в географическом происхождении, поскольку условия произрастания, климат и почва могут влиять на состав и концентрацию активных соединений [6].

1.1.1 Свободно-радикальные реакции окисления биологически-активных веществ и их биологическое действие

В работах [4, 7 – 9] исследовались растительные экстракты и дрожжи, так как они характеризуются отсутствием побочных эффектов, низкой

токсичностью, антимикробного действия и важно отметить выживаемость дрожжей при соотношении химических препаратов в них [11]. Академик Н.М. Эмануэль впервые предположил, что повреждения, вызываемые свободными радикалами, могут играть важную роль в возникновении и развитии злокачественных новообразований [12]. Многие свободно-радикальные реакции инициируются анион-радикальной формой молекулярного кислорода, [13], называемой «супероксид», в как и в любом ион-радикале супероксид проявляет себя и как ион, и как радикал, что проявляется в двойственном характере его реакционной способности. Зависимость химических свойств анион-радикала кислорода наиболее сильно проявляется в апротонных и неполярных растворителях и наименее – в воде. В окислительно-восстановительных реакциях супероксид может быть как окислителем, так и восстановителем [4, 14].

Окислительные свойства анион-радикала кислорода в водных растворах выражены не так сильно, как в апротонных растворителях. В гидрофильной среде супероксид обладает более выраженными восстановительными свойствами. Константа скорости восстановления супероксидом паранитротетразолия хлорида, который используется в качестве индикатора $O_2^{\cdot-}$, достаточно высока ($6,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при pH=7 и $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ при pH=10) [16]. Супероксид с ионами железа и меди из ферментной композиции восстанавливает свободные металлы и их низкомолекулярные комплексы [17]. В 1954 г Гершман и Жильберт (Gershman, Gilbert) предположили, что многие из токсических эффектов кислорода на организм связаны с кислородными радикалами [18]. Позже эта гипотеза, известная сейчас как супероксидная теория кислородной токсичности [20], была развита и экспериментально подтверждена в работах Фридовича [4].

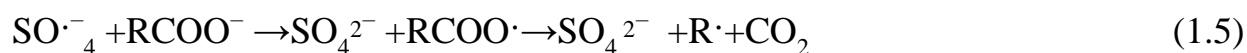
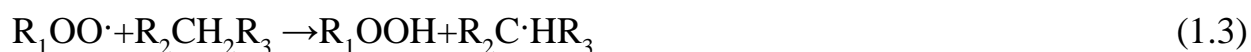
Таблица 1.1.1. Методы регистрации супероксид анион-радикала O_2^- [4, 15]

1	Спектрофотометрия	NBT-тест, цитохром <i>c</i>	<p>Наиболее простым методом регистрации O_2^- является NBT-тест, в основе которого лежит реакция восстановления красителя нитросинего тетразолия (NBT – nitroblue tetrazolium) до диформаза с образованием стабильного промежуточного продукта-частично восстановленного моноформаза, образование которого легко регистрируется спектрофотометрический по поглощению при 550-560 нм [4].</p>
---	-------------------	-----------------------------	---

2	ЭПР	<p>Гидроксилами 1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин, который при окислении O_2^- образуется стабильный нитросильный радикал 4-оксо-2,2,6,6-тетрамети-пиперилин-1-оксалама</p>	<p>O_2^- является радикалом, в принципе его образование может быть измерено с помощью ЭПР, однако практически такой способ анализа мало приемлем в связи с небольшим значением время жизни O_2^- и его низкими концентрациями в биологических жидкостях, предельные концентрации обнаружения O_2^- простым ЭПР методом составляют около 10^{-8} М [4].</p>
3	Хемилюминисценция	<p>Люминол, его аналоги (изолуминол, 8-амино-5-хлоро-7-фенилпиродол пиридазин-1,4-(2Н,3Н)дион, люци-генин, люциферины и их аналоги, фолазин (гликопротеин-связанный люциферин моллюска <i>Pholas dactylus</i>), CLA и MCLA (аналоги люмиферина рачкам <i>Cypridina</i>), целентеразин</p>	<p>В основе которых лежит измерение свечения, возникающего в реакциях O_2^- с люминофорами[4].</p>

4	Флуоресценция	<p>Определение 4-метил-β-D-умбеллиферона, образующегося в реакции O_2^- с 4-метил-β-D-умбеллиферил глюкопиранозидом</p>	<p>Основанные на снижении интенсивности и флуоресценции 1,3-дифенилизобензофурана при взаимодействии с O_2^- [4].</p>
5	Амперометрия	<p>Возможно окисление гидроэтидина, пероксида водорода, гипохлоритом с, пероксинитритом, цитохром с</p>	<p>O_2^- в микрослоях среды у поверхности одиночных клеток крови, это позволяет избежать применения химических реагентов, многие из которых обладают высокой токсичностью [4].</p>

В настоящее время роль анион-радикала кислорода в возникновении заболеваний доказана, но механизмы этого процесса все еще изучаются. В результате обобщения данных о химической активности анион-радикала кислорода показано, что повреждение и гибель клеток в присутствии O_2^- -генерирующих систем не может быть следствием его прямого взаимодействия с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами. Есть экспериментальное обоснование того, что цитотоксическое действие O_2^- косвенное через образование других форм активированного кислорода: протонированного анион-радикала кислорода (HO_2^\bullet), синглетного кислорода (1O_2) [21], гидроксильного радикала ($\bullet OH$), пероксинитрита ($ONOO^-$). Углеродцентрированные радикалы [22] могут образовываться в результате вторичных реакций алкоксильных (1.1, 1.2), пероксильных (1.3), азотцентрированных радикалов (1.4) или в результате декарбоксилирования карбоксильной группы (1.5) [4, 23].



В присутствии кислорода углерод-центрированные радикалы вступают в реакции с образованием пероксильных радикалов, которые через цепь последовательных реакций могут приводить к образованию гидропероксидов, алкоксильных радикалов и гидроксильных производных белка (или спиртов) [4, 24].

В отсутствие кислорода углеродцентрированные радикалы могут выступать в реакции друг с другом, образуя межбелковые связи (1.6):



Реакции углеродцентрированных радикалов с кислородом протекают со скоростями, близкими к диффузионно-контролируемому пределу ($k \approx (10^9 - 10^{10}) \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), тогда как димеризация радикалов является более медленным процессом, скорость которого во многом определяется структурными особенностями белковой молекулы [4, 25].

Углеродцентрированные радикалы способны отрывать атомы водорода от соответствующих доноров (1.7):



Из литературных данных известно [26]: водные растворы спиртов, как и чистые спирты дают при облучении в отсутствие кислорода водород, альфа-гликоль и карбонильные соединения. В случае разбавленных растворов этанола выход продуктов соответствует отщеплению атомов водорода атомами водорода (с образованием H_2) или гидроксильными радикалами. Образующиеся при этом органические радикалы либо димеризуются с образованием гликоля, либо диспропорционируют до альдегида. В присутствии кислорода водные растворы этанола дают в три раза больше ацетальдегида, чем в его отсутствие. В более концентрированных растворах выход ацетальдегида составляет $G=6$. Другим основным продуктом является пероксид водорода, а выход гликоля полностью подавлен [4].

При радиоллизе деаэрированного этанола основными молекулярными продуктами являются ацетальдегид (АА) и бутандиол-2,3 (БД), которые образуются с равной вероятностью в реакциях диспропорционирования и рекомбинации альфа-гидроксиэтильных радикалов (ГЭР) [4, 27].

Предотвратить разрушительные процессы, вызываемые свободными радикалами, можно веществами, называемыми антиоксидантами или ингибиторами окисления. По механизму действия антиоксиданты

подразделяются: на снижающие скорость инициации цепной реакции и на гасящие (прерывающие) развитие цепной реакции [4, 15, 28].

Специальные соединения – антиокислители (антиоксиданты), ингибирующие радикалы и тем самым снижающие их токсичность, обладают и радиопротекторным действием [4, 29, 30, 31].

Известно, что антиоксидантная активность полифенольных соединений [32, 33] позволяет контролировать процессы свободно-радикального окисления органических молекул и содержания накапливающихся перекисных радикалов [34, 18]. Лишь в редких случаях доказано, что активные формы кислорода (АФК), азота (АФА) и/или серы (АФС) являются первопричиной заболеваний, но повышение их уровня сопровождается целый ряд болезней, среди которых особенно много с данной точки зрения известно о сердечнососудистых нейродегенеративных патологиях, сахарном диабете и т.д. Наибольшее внимание традиционно уделяется активным формам кислорода (АФК), однако с конца 1970-х годов, когда была установлена регуляторная роль оксида азота ($\bullet\text{NO}$) в клеточных функциях, количество исследований в этой области начало стремительно расти [46]. Активные формы серы и углерода начали изучать относительно недавно – здесь мы находимся только в начале пути, но уже сейчас нет сомнения в их важности для функционирования клетки. К АФК относят супероксиданион (O_2^-), пероксиды водорода (H_2O_2) и других соединений (ROOH), гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$) и т. д. К АФА относят оксид азота ($\bullet\text{NO}$) и ряд его производных, например, пероксинитрит (OONO-). К АФС относят тиольный радикал ($\text{RS}\bullet$) и его производные. Для всех перечисленных выше соединений характерна высокая реакционная способность. Пути их генерации в живых системах разнообразны и связаны с участием активных форм кислорода и азота. Еще одному типу биополимеров, белкам, также подвергаемым атаке активными формами, начали уделять серьезное внимание только в последние 15–20 лет. Поскольку в отечественной литературе данная проблема освещена недостаточно, представляется целесообразным рассмотреть её более подробно в рамках настоящего исследования. На первый взгляд может показаться, что

свободнорадикальная модификация белков не столь важна для выживания клеток, как окисление липидов или ДНК. Но это не совсем так. Оказывается, важно не только то, что свободнорадикальная модификация может привести к потере функции белка, но и то, что такого рода модификацию белков живые организмы используют для сигнализации, межклеточной коммуникации и получения информации из внешней среды [46].

1.1.2 Методы исследования реакционной способности полифенольных веществ

В физической химии применяют источники ионизирующего излучения для генерации в растворе высокореакционных частиц и моделируют реакции взаимодействия органических веществ с радикальными частицами [35, 36]. На опыте методы определения реакционной способности веществ полифенольной природы различают на прямые и косвенные [37]. В основе прямых методов заложен процесс возникновения свободных радикалов, промежуточных комплексов и их исследование с помощью современных методов физической химии: полярографии [38], импульсного радиолиза [39, 40] и хемилюминесцентного анализа, ЭПР. Косвенные методы основаны на измерении изменения концентрации фенольных веществ в эксперименте с помощью спектрофотометрии [41,42], ЭПР, вольтамперометрически [44, 45, 47], хроматографически [33, 48]. Лучший метод исследования быстрых химических реакций и их короткоживущих продуктов – импульсный фотолиз, который позволяет обнаруживать возбужденные состояния молекул и короткоживущих продуктов их превращений [49]. Из работ по импульсному радиолизу известно, что при реакции радикала $\bullet\text{OH}$ с ароматическими молекулами (ArH) образуется ($\text{Ar}(\bullet\text{OH})\text{H}$). Максимум поглощения большинства аддуктов присоединения радикала $\bullet\text{OH}$ к производным бензола проявляется в области 310—350 нм (320—330 нм для радикала $\text{Ph}(\text{OH})_2\bullet$). Эти данные позволяют предположить, что

первичная промежуточная полоса поглощения с максимумом при 335 нм отвечает радикалу $\text{Ph}(\text{OH})_2\bullet$ [50]. Радикал $\text{Ph}(\text{OH})_2\bullet$ элиминирует молекулу воды с образованием вторичного феноксильного радикала $\text{PhO}\bullet$, причем данный процесс ускоряется в присутствии кислот и щелочей. Феноксильный радикал обладает спектром поглощения с максимумами при 380 нм и 400 нм. Такую частицу обнаружили с помощью импульсного фотолиза [51] при изучении водных растворов фенола. В дальнейшем получены спектры замещенных феноксильных радикалов, содержащие полосы поглощения в районе 370—430 нм, которые по форме и положению близких полосам в спектре незамещенного феноксильного радикала. Таким образом, данные лазерного импульсного фотолиза свидетельствуют о последовательном образовании радикалов $\text{Ph}(\text{OH})_2\bullet$ и $\text{PhO}\bullet$ при возбуждении комплекса $\text{FeO}(\text{H}_2\text{O})_2^{2+}$ в присутствии фенола. Эти результаты прямого метода определения реакционной активности дали возможность предложить реакции с промежуточными частицами радиолиза. Показано, что происходит образование двух изомеров радикала $\text{Ph}(\text{OH})_2\bullet$, которые трансформируются в феноксильный радикал $\text{PhO}\bullet$ с отщеплением молекулы воды. На основе сопоставления расчетных и экспериментальных кинетических кривых определены коэффициенты экстинкции и константы скорости реакций радикальных частиц. Среди конечных продуктов фотохимических превращений найдены хинон и дифенохиноны [52]. Среди косвенных методов зарекомендовано применение дифенилпикрилгидразида – стабильного во времени при нормальных условиях свободного радикала. Он имеет способность восстанавливаться и изменять свою окраску в среде, и его используют при исследовании реакционной способности полифенольных веществ с помощью простого метода спектрофотометрии. Скорость его восстановления зависит от реакционной способности антиоксиданта напрямую [4, 53].

1.1.3 Окислительный стресс и влияние препаратов растительного и микробного происхождения на стресс-ответ у микроорганизмов в присутствии и отсутствии кислорода

Неопровержимые факты свидетельствуют о том, что окислительный стресс может привести к повреждению клеток и тканей. Вместе с тем свободные радикалы, образующиеся при окислительном стрессе, также образуются в ходе нормального метаболизма и, таким образом, участвуют как в поддержании гомеостаза, так и в патогенезе заболеваний.

Свободные радикалы участвуют в реакциях, катализируемых ферментами, транспорте электронов в митохондриях, передаче сигналов, регуляции экспрессии генов и активации ядерных факторов транскрипции. Вместе с тем они могут вызывать окислительное повреждение молекул, клеток и тканей, участвовать в антимикробной активности нейтрофилов и макрофагов, а также способствовать процессам старения и развитию различных заболеваний. Другие производные кислорода виды свободных радикалов, такие как супероксидные или гидроксильные радикалы, образующиеся в процессе метаболизма или под действием ионизирующего излучения, являются более сильными окислителями и поэтому более опасны (Другие производные кислорода: супероксидный и гидроксильный радикалы - образуются в процессе метаболизма или под действием ионизирующего излучения. Эти соединения являются более сильными окислителями по сравнению с другими свободными радикалами и, следовательно, представляют большую опасность для клеточных структур.) [53].

В дополнение к исследованиям биологических эффектов этих активных форм кислорода набирают обороты исследования активных форм азота. NO, или монооксид азота (оксид азота), представляет собой свободный радикал, генерируемый NO-синтазой (NOS). Этот фермент модулирует физиологические реакции, такие как расширение сосудов или сигнализация в головном мозге. Однако во время воспаления индуцируется синтез NOS (iNOS). Это iNOS может привести к перепроизводству NO, вызывая ущерб. Более серьезную

обеспокоенность вызывает тот факт, что избыток оксида азота (NO) может реагировать с супероксидом с образованием высокотоксичного соединения пероксинитрита. Образующийся пероксинитрит способен вызывать окисление липидов, белков и ДНК, что повышает риск повреждения тканей [53].

Как активные формы кислорода, так и азот участвуют в нормальной клеточной регуляции, в которой оксиданты и окислительно-восстановительный статус играют важную роль в передаче сигналов. Окислительный стресс все чаще рассматривается как основной компонент сигнального каскада, участвующего в воспалительных реакциях, которые стимулируют образование молекул адгезии и хемоаттрактантов. Пероксид водорода, которая расщепляется с образованием гидроксильных радикалов, также может активировать NF- κ B, транскрипционный фактор, участвующий в стимулировании воспалительных реакций. Избыточная продукция этих реактивных форм токсична, оказывает цитостатическое действие, вызывает повреждение мембран и активирует пути гибели клеток (апоптоз и/или некроз).

Действительно, практически все ранее упомянутые заболевания связаны с избыточным образованием или нарушенной регуляцией свободных радикалов. Таким образом, существует тонкий баланс между оксидантами и антиоксидантами, нарушение которого может способствовать развитию заболеваний. Поддержание этого равновесия имеет ключевое значение для сохранения здоровья и замедления процессов старения.

Термин «окислительный стресс» означает, что антиоксидантный статус клеток и тканей изменяется под воздействием оксидантов. Таким образом, окислительно-восстановительный статус влияет на степень окисления компонентов клетки.

В клетках живого организма происходит естественный процесс обмена веществ, известный как окислительно-восстановительный обмен веществ. Окисление и восстановление вместе называются окислительно-восстановительными процессами (восстановлением и окислением). После этой химической реакции энергия, которая называется АТФ (аденозинтрифосфат),

вырабатывается для выполнения другой функции организма. Атомы, теряющие или приобретающие электроны внутри клеток, выделяют не только АТФ, но и свободные радикалы. Молекулы, стимулирующие антиоксиданты (глутатион, супероксиддисмутаза СОД, каталаза) в организме, выходят изнутри клеточного метаболизма. Так что это означает, что клетки поддерживают свободные радикалы. Но не исключено, что в этом процессе может произойти дисбаланс ситуации. Неравновесие между активностью свободных радикалов и активностью антиоксидантов называется окислительным стрессом. Когда клетки больше не могут удерживать свободные радикалы, это становится риском для клетки к окислительному повреждению. Тогда могут оказаться фатальными важные молекулы (ДНК, белок) клетки. Антиоксидантные молекулы, такие как глутатион, супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, синтезируются в организме в ходе клеточного метаболизма. Таким образом, клетки способны контролировать уровень свободных радикалов. Однако в определённых условиях может возникнуть дисбаланс между продукцией свободных радикалов и активностью антиоксидантной системы. Это состояние известно как окислительный стресс. Когда клетки больше не справляются с избыточным количеством свободных радикалов, возрастает риск окислительного повреждения жизненно важных клеток.

Оксидантный стресс приводит к нарушению обмена веществ, энергетического баланса в организме: клетки повреждаются, начинаются патологические изменения в тканях и органах человека. Под воздействием прооксидантов происходит окисление нуклеиновых кислот — перекисное окисление липидов, клеточных мембранных оболочек и белковых структур. Клетки, атакованные прооксидантами, перестают снабжаться питательными веществами, витаминами и микроэлементами, из-за дефицита которых в первую очередь страдает кровеносная система. Распространение прооксидантов стремительно увеличивается, что сказывается на количестве мутирующих и поврежденных клеток [54].

Повышенной нагрузке подвергается иммунная система, не справляющаяся с количеством повреждённых молекул. В результате снижения иммунитета начинаются воспалительные процессы, приводящие к хроническим заболеваниям. Метаболические изменения провоцируют возникновение нарушения обмена веществ, и связанных с ним тяжелых заболеваний.

Причины оксидантного стресса:

1. Неблагоприятные экологические условия.
2. Генетическое старение человеческого организма.
3. Развитие патогенных микроорганизмов (бактериальных или вирусных) при ослабленном иммунитете.
4. Стрессовые состояния и психосоматическая предрасположенность к нервному напряжению.
5. Воздействие ионизирующего и ультрафиолетового излучения включая длительное пребывание на солнце.
6. Токсичные вещества в составе средств косметической и бытовой химии.
7. Консерванты, нитраты, нитриты и другие вредные составляющие продуктов питания.
8. Длительный приём лекарственных препаратов.
9. Электромагнитные и радиационные излучения.
10. Нарушения пищевого поведения: переедание, чрезмерное потребление жиров, развитие гнилостных процессов в кишечнике.
11. Алкогольная, табачная и другие наркотические зависимости.
12. Недостаточное пребывание на свежем воздухе и ограниченная физическая активность.

Первичное действие ионизирующих излучений:

В 1940-х годах произошло объединение радиобиологии и радиационной химии. Это было обусловлено предположением, что негативное воздействие ионизирующего излучения на организм начинается с радиационно-химических процессов, протекающих в воде - основном компоненте клеток живых организмов. Действительно, вода составляет в среднем около 70% массы живого

организма, а потому именно она в первую очередь подвергается действию радиации. В процессе радиолиза воды особое значение имеют радикальные продукты, возникающие вследствие ионизации и последующего взаимодействия ион-электронных пар, образующихся под действием излучения [54, 55]:



Далее в результате ион-молекулярной реакции за время меньше 10^{-12} с (1.9):



Около 1 пс занимает процесс термализации электрона, образованного при воздействии излучения, и выбитый электрон будет в нанополости с подходящей ориентацией молекул H_2O образовывать гидратированный электрон (e^-_{aq}):



После гидратирования электрон переходит в возбужденное состояние, поглощая при этом фотом, обладающей энергией 2 эВ. Данный процесс позволяет ученым следить за электроном при помощи спектров оптического поглощения

Гидратированный электрон в значительном количестве он образуется в цитоплазме клетки [56] и принимает участие в большом числе химико-биологических реакций [54, 56].

В воде, насыщенной кислородом, сольватированный электрон образует супероксид-анион (O_2^-), благодаря которому в организме функционируют многие биохимические системы:





Впоследствии эти частицы взаимодействуют с молекулами внутри клетки (обозначим биомолекулы как R-β), в результате чего генерируются биорадикалы Rβ[•](-H), т.е.:



Считается, что биомолекулы R-β, большой процент которых содержится в воде внутри молекул, уменьшают потенциал ионизации воды. По этой причине реакция косвенной ионизации молекул (1.17) соперничает с ион-молекулярной реакцией (1.13). При помощи этой реакции происходит передача электрона к растворителю от вещества, содержащегося в нем [55, 57]:



Радиационное влияние на живой организм имеет название «*теория косвенного радиобиологического действия*»: продукты радиолиза воды (радикалы OH и O₂⁻), гидратированные электроны (e⁻_{aq}) и молекулы перекиси водорода (H₂O₂) главным образом вызывают первичные радиобиологические эффекты. И можно защититься от радиации за счет веществ, которые акцептируют свободные радикалы, или усилить эффект ионизирующих излучений за счет радиосенсибилизаторов. [58, 60]. При облучении (гамма-лучи и рентгеновские лучи) в присутствии кислорода образуются перекисные радикалы, они усиливают воздействие радиации на организм за счет реакции с ДНК или ферментами. уменьшения концентрации кислорода (гипоксии) в тканях повышает выживаемость клеток. Кислородный эффект при альфа-излучении

практически отсутствует. Явление кислородного эффекта активно используется в лучевой терапии: для эффективного лучевого поражения больных тканей медики во время терапии добиваются повышения содержания кислорода в больных тканях пациента, одновременно с этим уменьшая содержание кислорода в здоровых тканях. Таким образом удастся успешно поражать больные ткани, сохраняя при этом здоровые [61].



Рисунок 1.1.1 – Кривые выживаемости клеток, подвергнутых облучению:
1 – в воздухе, 2 – в азоте (Ярмоненко, 1984). [62]



Рисунок 1.1.2 – Зависимость радиочувствительности клеток от концентрации кислорода (% от атмосферного) (Ярмоненко, 1984) [62].

1.1.4 Антиоксидантные свойства рутина как соединения фенольной природы

Рутин и его свойства [63, 64] Рутин, известный также как рутозид, кверцетин-3-О-рутинозид или софорин, представляет собой гликозид, в составе которого сочетаются флавонол кверцетин и дисахарид рутиноза (α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопираноза). Этот флавоноид содержится во множестве растений, включая различные виды цитрусовых.

По своей химической природе рутин относится к классу флавоноидов, а именно к гликозидам флавонолов. Флавоноиды (или биофлавоноиды) образуют обширную группу биологически активных соединений, часто объединяемых условным термином «витамин Р». Они известны способностью укреплять стенки кровеносных капилляров, а также проявляют антиаритмические, антигипертензивные и антиоксидантные свойства.

Флавоноиды чрезвычайно распространены в растительном мире. Их особенно много в плодах цитрусовых, ягодах черноплодной рябины, а также в листьях чая. На сегодняшний день описано более 5000 природных флавоноидов. К флавонолам и их производным, помимо рутина, относятся кверцетин, кемферол, мирицетин и изорамнетин. В 1936 году из лимона и паприки впервые было выделено вещество, способное уменьшать ломкость и проницаемость капилляров, которое получило название витамин Р (от англ. *permeability* — проницаемость).

Источники рутина и биофлавоноидов. Наиболее богатыми источниками рутина и других гликозидов флавонолов являются яблоки, абрикосы, черная смородина, черника, голубика, земляника, брусника, малина, вишня, сливы, шиповник, виноград, репа, щавель, а также зеленый и черный чай.

Физиологическое значение. Как и другие биофлавоноиды, рутин укрепляет стенки капилляров, снижая их проницаемость и повышая устойчивость. Существенную роль в его действии играют антиоксидантные свойства, в частности способность тормозить процессы перекисного окисления липидов.

Это способствует снижению риска развития сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, а также проявлению радиопротекторных эффектов.

Фенольные соединения и их биологическая роль. Анализ литературных данных показывает, что основная функция фенольных соединений заключается в защите клеток от неблагоприятных факторов внешней среды. Благодаря выраженным акцепторным свойствам они обладают сильной антиоксидантной активностью. Фенолы способны связывать ионы тяжелых металлов, образуя устойчивые комплексы и нейтрализуя их каталитическое действие, а также улавливать свободные радикалы, возникающие при процессах аутооксидации. Тем самым они разрывают цепные свободнорадикальные реакции. Особую активность проявляют хинонные формы фенолов, которые способны взаимодействовать с белками, вызывая их дубление.

Антирадикальные свойства фенольных соединений и их способность блокировать свободнорадикальные процессы играют важную роль в проявлении антимуtagenного эффекта, уменьшая вероятность наследственных нарушений.

Наиболее эффективными ловушками радикалов являются фенольные антиоксиданты, в молекулярной структуре которых присутствует ароматическое кольцо с одной или несколькими гидроксильными группами. Ключевым элементом, обеспечивающим антиоксидантное действие, является гидроксильная группа, связанная с ароматическим ядром. За счет π -электронной системы ароматического кольца происходит перераспределение отрицательного заряда на атом кислорода, что облегчает отрыв водорода от ОН-группы и приводит к образованию различных изомерных форм феноксильных радикалов. Эти радикалы эффективно нейтрализуют перекисные и алкоксильные радикалы.

Особый интерес представляют фенолы и как доноры электронов, участвующие в реакциях с пероксидом водорода, что еще больше расширяет их биологическое значение.

1.2 Радиолит различных биологически-активных веществ и других химических препаратов

Радиолит представляет собой процесс химического изменения веществ под воздействием ионизирующего излучения (например, γ -излучения, рентгеновских лучей, электронного облучения и др.). В результате такого воздействия молекулы могут разрушаться, претерпевать структурные изменения или образовывать новые соединения. Это явление существенно влияет на стабильность биологически активных веществ и химических препаратов, что необходимо учитывать при их хранении, стерилизации и использовании в медицине, фармацевтике и биотехнологиях.

Одними из первых радиационному воздействию подвергаются молекулы воды, входящие в состав или окружающие биологические структуры. Радиолит воды приводит к образованию высокоактивных кислородсодержащих форм, таких как гидроксильные радикалы ($\bullet\text{OH}$), ионы водорода (H^+), атомарный водород ($\text{H}\bullet$) и ероксид водорода (H_2O_2). Эти реакционноспособные частицы могут взаимодействовать с биомолекулами, инициируя процессы окисления, разрушения химических связей и синтеза новых соединений.

Белки в условиях радиолита могут подвергаться денатурации, фрагментации полипептидных цепей, окислению аминокислотных остатков и агрегации. Особенно чувствительны аминокислоты, содержащие ароматические (тирозин, фенилаланин) и серосодержащие (метионин, цистеин) группы.

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) также уязвимы к радиационному воздействию. Радиолит может вызывать разрывы в цепи, образование апуриновых и апириимидиновых сайтов, а также химические модификации азотистых оснований. Повреждения ДНК являются одним из основных механизмов радиационного поражения клеток.

Углеводы при радиационном облучении могут подвергаться фрагментации, дегидратации и образованию свободных радикалов, что нарушает структуру полисахаридов и снижает их биологическую активность.

Липиды особенно подвержены перекисному окислению, индуцируемому радиацией. Этот процесс разрушает клеточные мембраны и сопровождается образованием токсичных продуктов, таких как малоновый диальдегид (MDA) и 4-гидроксиноненаль (4-HNE).

Химические препараты, включая витамины, гормоны, антибиотики и другие фармакологически активные вещества, также могут разрушаться или изменять свои свойства под действием радиации. Например, витамин С (аскорбиновая кислота) окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты, а антибиотики из группы пенициллинов теряют активность из-за разрушения β -лактамного кольца.

Тем не менее, существует ряд соединений, устойчивых к радиолизу, которые сохраняют свою активность после стерилизации ионизирующим излучением. Для повышения стабильности биологически активных веществ при облучении разрабатываются специальные методы защиты, включающие использование радиопротекторов, хранение при низких температурах и в условиях инертной атмосферы.

Таким образом, понимание механизмов радиолиза биологически активных веществ и препаратов имеет важное значение для радиобиологии, медицинской физики, фармацевтики, а также для совершенствования технологий стерилизации и хранения лекарственных средств.

1.2.1 Радиационно-химические превращения фенольных соединений

Флавоноиды – полифенольные соединения, содержащие 15 углеродных атомов, образующих два ароматических кольца (А и В), соединённых с помощью трёхуглеродного мостика (кольцо С) (рис. 1.2.1).

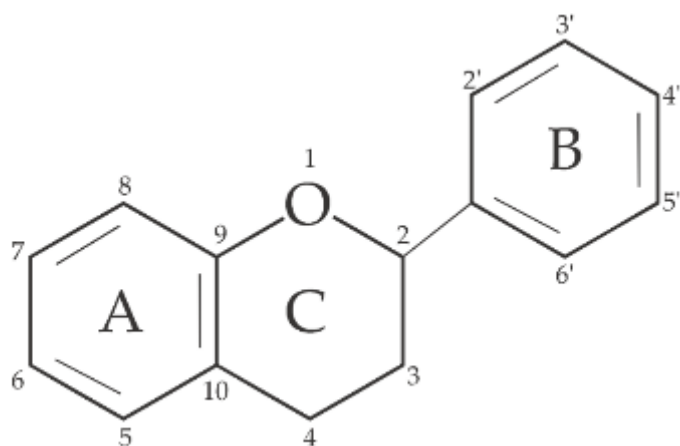


Рисунок 1.2.1 – Химическая структура флавоноидов

Флавоноиды представляют собой фенольные вещества, выделенные из широкого спектра растений, с более чем 8000 отдельных известных соединений. Флавоноиды образуются в растениях из ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и малоната. Основу структуры флавоноидов составляет скелет флавана, включающий 15 атомов углерода, организованных в три кольца, обозначаемые как А, В и С (рис. 1.2.1). Классификация флавоноидов основывается на степени окисления и особенностях замещения в С-кольце, в то время как различия между отдельными представителями одного класса определяются типом и положением заместителей в А- и В-кольцах. Среди разнообразных классов флавоноидов наибольший научный интерес вызывают флавоны, флаваноны, изофлавоны, флавонолы, флавонолы (возможно, имелись в виду флавонолы и флаваноны, если в оригинале была ошибка), а также флаван-3-олы. Кроме того, к флавоноидам также относят такие группы, как бифлавоны, халконы, ауроны и кумарины. [65].

Антиоксидантное действие флавоноидов реализуется через несколько ключевых механизмов: подавление образования активных форм кислорода (АФК) за счёт ингибирования ферментативной активности, непосредственное устранение уже образовавшихся АФК, а также укрепление иммунной системы.

Флавоноиды способны ингибировать ферменты, ответственные за генерацию супероксидных анионов, включая ксантиноксидазу и протеинкиназу.

Кроме того, установлено, что они подавляют активность таких ферментов, как циклооксигеназа, липоксигеназа, митохондриальная монооксигеназа, глутатион, митохондриальная сукциноксидаза и НАДН-оксидаза — все они участвуют в формировании активных кислородсодержащих частиц.

Дополнительно, флавоноиды обладают способностью к хелатированию микроэлементов, играющих важную роль в процессах кислородного обмена. В частности, ионы железа и меди могут катализировать образование АФК, участвуя в восстановлении перекиси водорода с образованием высокореактивных гидроксильных радикалов. Таким образом, связывание этих металлов флавоноидами предотвращает образование опасных радикалов и снижает окислительный стресс в клетках. [66].



Рисунок 1.2.2 – Взаимодействие ионов железа и меди с пероксидом водорода

Связывание флавоноидов с микроэлементами происходит за счёт специфических функциональных групп, расположенных в их молекуле. Основными участками хелатирования являются: катехольный фрагмент в В-кольце, 3-гидроксильная и 4-оксогруппа в гетероциклическом (С) кольце, а также 4-оксогруппа и 5-гидроксильная группа, расположенные между С-кольцом и А-кольцом.

Наибольший вклад в способность флавоноидов к хелатированию металлов вносит именно катехиновая структура. Это подтверждается, в частности, сравнением хелатирующих свойств кверцетина и кемпферола: у кверцетина, содержащего катехольную группу в В-кольце, наблюдается более выраженный батохромный сдвиг при взаимодействии с ионами меди, чем у кемпферола, у которого эта группа отсутствует. Это свидетельствует о ключевой роли катехольного фрагмента в процессе комплексообразования с металлами [67].

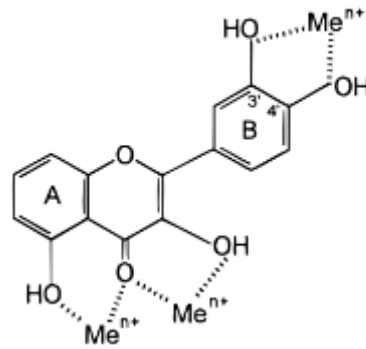


Рисунок 1.2.3 – Связывания ионов металлов флавоноидами

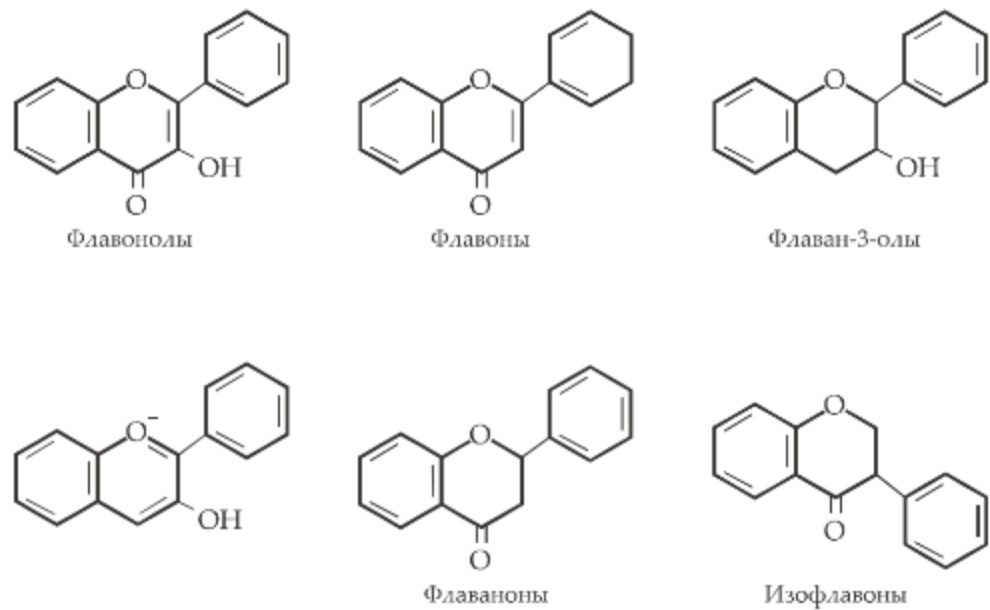


Рисунок 1.2.4 – Химическая структура флавоноидов

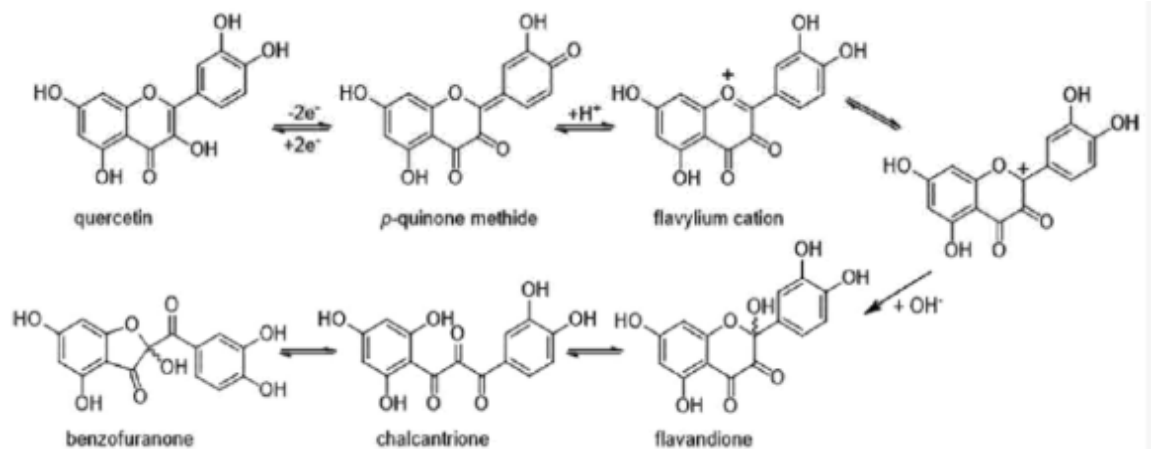


Рисунок 1.2.5 – Последовательность химических структур и реакций, предложенных для участия в окислительном превращении кверцетина

Среди пищевых флавоноидов кверцетин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонол или 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол, изображённый на рис. 1.2.5) остаётся одной из наиболее изученных молекул. Его высокая антиоксидантная активность объясняется наличием нескольких гидроксильных групп, а также особым пространственным расположением В-кольца, обуславливающим его скручивание относительно остальной молекулы.

Как показано на рисунке 1.2.5, двухэлектронное окисление кверцетина приводит к образованию промежуточного соединения – пара-хинонметида, который, подвергаясь протонированию, преобразуется в катион флавилия. Этот катион быстро гидратируется, образуя 2,5,7,3',4'-пентагидрокси-3,4-флавандион. Далее происходит серия таутомерных превращений, в ходе которых формируется промежуточное соединение – 2,3,4-халкантрион, переходящее в конечный полярный метаболит, идентифицированный как 2-(3,4-дигидроксибензоил)-2,4,6-тригидрокси-3(2H)-бензофуранон.

Антиоксидантные свойства флавоноидов, включая кверцетин, напрямую связаны с особенностями их химической структуры. Эти соединения способны нейтрализовать активные формы кислорода (АФК) либо путём донорства атома водорода, либо выступая в роли электронных доноров. В результате такого взаимодействия свободные радикалы теряют свою реакционную способность. Сами флавоноиды при этом становятся радикалами, однако благодаря делокализации заряда и устойчивости своей структуры, они значительно менее реакционноспособны, что снижает риск их участия в дальнейших разрушительных реакциях. [68].

Существует и альтернативная точка зрения, согласно которой образующийся в результате реакции феноксильный радикал отличается нестабильностью. Одной из его характерных черт является способность к делокализации неспаренного электрона, то есть его перераспределению по ароматическому кольцу с образованием нескольких резонансных структур. Благодаря этому радикал может вступать во взаимодействие с другими свободными радикалами, что, возможно, объясняет проявление прооксидантных

свойств у некоторых флавоноидов.

По другой гипотезе, ключевое значение имеет именно механизм отдачи атома водорода, так как перенос электрона требует значительно большей энергии. Способность флавоноидов нейтрализовать свободные радикалы при этом во многом определяется числом гидроксильных групп и их расположением в молекуле.

Важно отметить, что в настоящее время существует общий научный консенсус по поводу механизма взаимодействия флавоноидов со свободными радикалами. Эта концепция была впервые предложена в виде гипотезы W. Bors и его коллегами в 1990 году и впоследствии получила широкую поддержку в научном сообществе. [69].

Как уже отмечалось, антиоксидантные свойства флавоноидов основаны на способности их фенольных групп вступать в окислительно-восстановительные реакции. Во время таких реакций одна или несколько гидроксильных групп флавоноидной молекулы отдают электрон или атом водорода активным формам кислорода (АФК), тем самым стабилизируя их. Этот процесс лежит в основе механизма нейтрализации АФК.

Помимо прямого воздействия на активные формы кислорода, некоторые флавоноиды способны усиливать антиоксидантную защиту организма посредством непрямого механизма. Он заключается в активации экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, и одновременно в подавлении экспрессии генов, ответственных за синтез ферментов, способствующих образованию АФК.

Флавоноиды взаимодействуют с радикалами, превращаясь в более стабильные и менее реакционноспособные формы. Благодаря высокой активности их гидроксильных групп, они эффективно “гасит” радикалы, снижая их повреждающее действие.

Кроме того, флавоноиды оказывают протективное действие при ишемии-реперфузии, подавляя активность индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS). Оксид азота (NO) синтезируется в различных типах клеток, включая

эндотелиальные клетки и макрофаги. Хотя NO необходим для регуляции сосудистого тонуса, его избыточное образование – особенно в активированных макрофагах – ведёт к повышенному синтезу как NO, так и супероксидных анионов. Эти два соединения реагируют с образованием пероксинитрита – мощного окислителя, способного вызывать повреждение липопротеинов и разрушение клеточных мембран.

Таким образом, флавоноиды, уменьшая концентрацию свободных радикалов, препятствуют образованию пероксинитрита и тем самым защищают клетки от окислительного стресса и структурных повреждений.

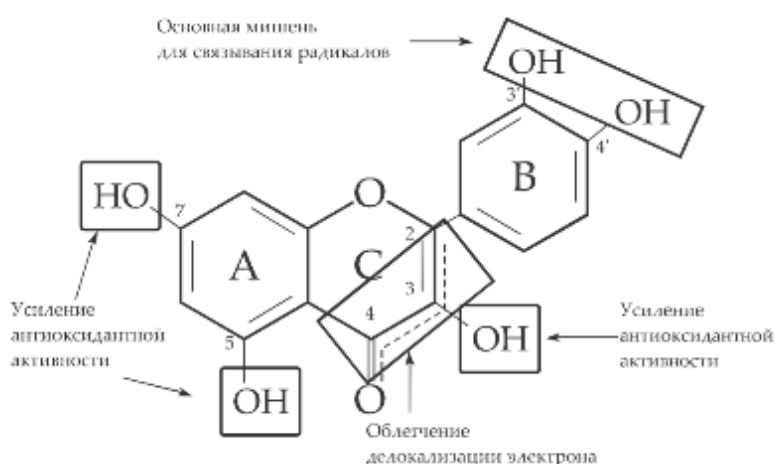


Рисунок 1.2.6 – Механизм связывания флавоноидами свободных радикалов кислорода

Гидроксильные группы в позициях 3' и 4', присоединённые к кольцу В и образующие катехольную структуру, являются ключевым элементом, обеспечивающим антиоксидантную активность флавоноидов. Именно эти группы играют основную роль в нейтрализации свободных радикалов. По сравнению с ними, аналогичные гидроксильные заместители в кольцах А и С демонстрируют значительно более слабое воздействие на активные формы кислорода (АФК).

Наличие двойной связи между атомами углерода 2 и 3 в сочетании с 4-оксо (карбонильной) группой в кольце С способствует эффективной делокализации электрона от кольца В. Эта делокализация стабилизирует радикальные формы, образующиеся в процессе взаимодействия флавоноидов с АФК, снижая их

реакционную способность.

Дополнительные гидроксильные группы в положениях 3, 5 и 7 кольца А и С, а также присутствие 4-оксо группы, усиливают антиоксидантные свойства флавоноидов. Это, по-видимому, связано с возможностью образования водородных связей между гидроксильными и оксо-группами, способствующих стабилизации молекулы и повышению её реакционной способности в отношении свободных радикалов. [70].

Считается, что основными мишенями для различных окислителей служат гидроксильные группы катехольной структуры кольца В, а также гидроксил в положении С-3. В процессе их окисления первоначально формируются нестабильные семихиноновые анион-радикалы, которые впоследствии преобразуются в орто-хиноны. Предполагается, что указанные гидроксильные группы могут участвовать в последовательных внутримолекулярных превращениях, представляя собой единый функциональный механизм антиоксидантной активности.

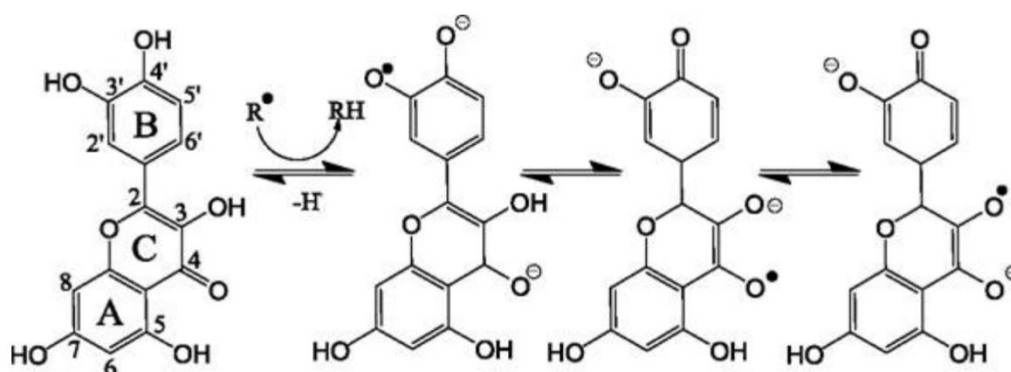


Рисунок 1.2.7 – Последовательность молекулярных превращений кверцетина, инициируемых атакой радикалов на катехольную группу кольца В.

Антиоксидантная активность флавоноидов *in vitro* зависит от расположения функциональных групп в его основной структуре. Как конфигурация, так и общее количество гидроксильных групп существенно влияют на механизм антиоксидантной активности. Гидроксильная конфигурация кольца В является наиболее важным фактором, определяющим

поглощение АФК, тогда как замена колец А и С мало влияет на константы скорости удаления супероксидных анион-радикалов [71].

Флавоноиды улавливают свободные радикалы за счёт отдачи атома водорода. Радикалы становятся неактивными в соответствии со следующим уравнением, где R^\bullet — свободный радикал, а $Fl-O^\bullet$ — флавоноидный феноксильный радикал (рис. 1.2.8.).

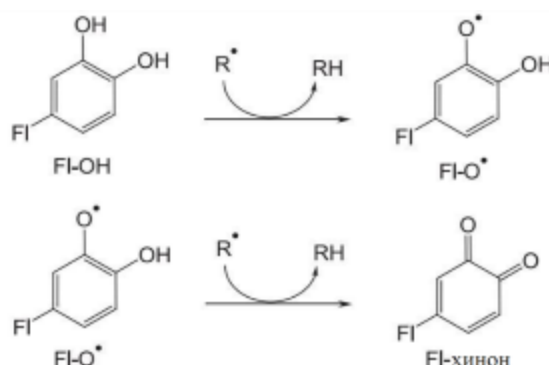


Рисунок 1.2.8 – Удаление активных форм кислорода (R^\bullet) флавоноидом.

Свободный радикал FlO^\bullet может реагировать со вторым радикалом, приобретая стабильную хиноновую структуру.

Основные структурные особенности флавоноидов, необходимые для эффективной очистки от радикалов, можно резюмировать следующим образом [69].

а) орто-дигидрокси (катехин) структура в кольце В, для делокализация электрона.

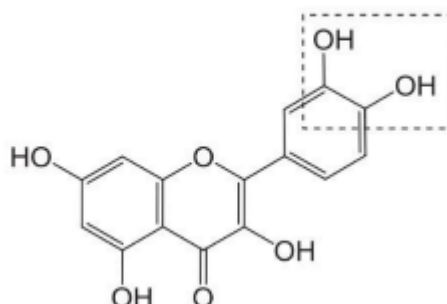


Рисунок 1.2.9 – Орто-дигидрокси (катехин) структура в кольце В.

б) 2,3-двойная связь в сопряжении с 4-оксофункцией в кольце С

обеспечивает делокализацию электрона из кольца В.

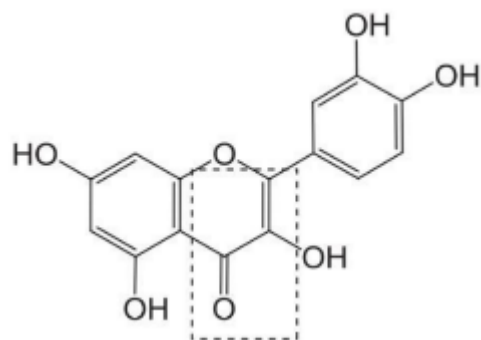


Рисунок 1.2.10 – 2,3-Двойная связь в сопряжении с 4-оксофункцией в кольце С.

в) гидроксильные группы в положениях 3 и 5 обеспечивают водородную связь с оксогруппой.

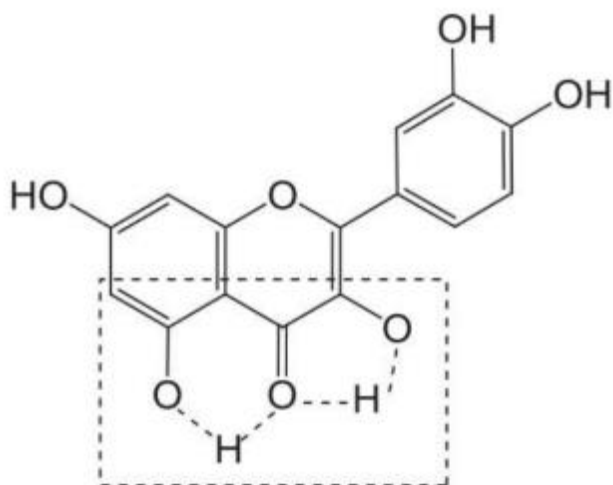


Рисунок 1.2.11 – Гидроксильные группы в положениях 3 и 5.

Согласно ранее сформулированным критериям наиболее эффективными поглотителями радикалов в водной фазе должны быть флавонолы кверцетин и мирицетин, что подтверждено экспериментально [72].

1.2.2 Радиоллиз фенола и пространственно-затрудненного фенола (2,6 – ди-трет-бутил-4-метилфенол)

Ионол, бутилгидрокситолуол, дибунол, агидол-1, ВНТ — 2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол как химический продукт известен с 1921 г., а в качестве лекарственного препарата под названием дибунол используется в нашей стране с 50-х годов прошлого столетия, накопился огромный материал [73-81]. В настоящее время 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол производится во многих странах мира (таблица 1.2.1).

Таблица 1.2.1 – Торговые наименования 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола, выпускаемого различными фирмами

Торговое наименование	Фирма-производитель	Содержание 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола, масс. %
АО-	Akron Chemical,	95,5
CAO-	Aschland Climical, США	98,8
CAO-	Aschland Climical, США	99,2
Vulkanox KB	Bayer, Германия	95,0
ВНТ	Bennett, Великобритания	97,5
Bissol 220	CDF, Франция	99,5
Appendix AOL	Ciba-Geigy, Швейцария	99,2
Antioxidant 29	Du Pont, США	97,5
Tenox ВНТ	Eastman Chemical Production, США	98,5
Nonox ТВС	ICI, Великобритания	99,2
Toranol ВНТ	ICI, Великобритания	95,5
Toranol 0	ICI, Великобритания	97,5
Toranol ОС	ICI, Великобритания	99,0
ВНТ(пищевой)	Koppers, США	99,0
DBPC	Koppers, США	96,5
Embanox BUT	May & Baber, Великобритания	98,8
Antioxidant KB	Mobey Chemical, США	95,5
Antioxidant DBPC	Organosintese, Франция	97,5
Nocrak	Oiichi Shinko, Япония	98,5
Annulex ВНТ	Pearson, Великобритания	97,0
ВНТ-Rasching	Raschig, Германия	98,5-99
Renadox DB	Rein Chemie, Германия	95,2

Продолжение таблицы 1.2.1		
ВНТ	Seilo Chemical, Германия	98,5
Ionol	Shell, США	99,5
Ionol CP	Shell, США	99,2
Antigen ВНТ	Sumimoto, Япония	97,5
Sustan ВНТ	UDP Chemical, США	98,5
Naugard ВНТ	Uniroyal Chemicals, США	98,5
Permanax ВНТ	Vulnax International,	99,2
Дибунол	Великобритания	99,2
Агидол	ИФХ РФН, Россия	97,5
Алкофен Б	СОПНХЗ, Россия	96,5
Алкофен БП	СОПНХЗ, Россия	98,5
Antioxidant 4	СОПНХЗ, Россия	97,0
Antioxidant 4k, 20	Чехия	98,5

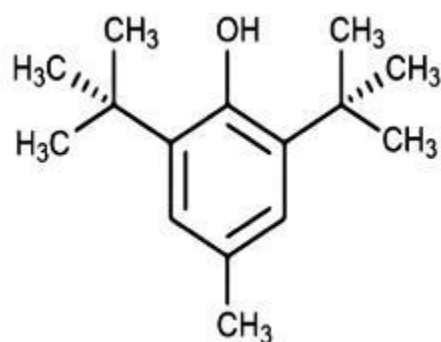


Рисунок 1.2.12 – 2,6 – ди-*трет*-бутил-4-метилфенол(ионол)

Белое кристаллическое вещество с температурой плавления 70 °С и температурой кипения 265 °С. Хорошо растворяется в изопентане, бензоле, метаноле, этаноле, ацетоне, сложных эфирах, толуоле, метилэтилкетоне и жирах. Практически нерастворим в воде и водных щелочных растворах. Относится к категории стабилизаторов, не вызывающих изменения цвета.

Применяется как стабилизатор для различных типов синтетических каучуков, включая бутадиен-стирольные, бутадиен-метилстирольные, бутадиен-нитрильные, бутадиеновые, изопреновые, уретановые и другие. Особенно эффективен в комбинации с производными вторичных аминов. Рекомендуемая дозировка – до 2%.

Используется также как антиоксидант для жиров, масел, витаминов, а также как ингибитор полимеризации при каталитическом окислении аллилового

спирта в глицидиловый спирт и глицерин. Применим в качестве ингибитора окисления гексадекана, реактивных топлив и других органических веществ.

Добавление антиоксидантов в концентрации 0,005–0,02 % эффективно замедляет процессы свободнорадикального окисления в пищевых продуктах, что существенно увеличивает срок их хранения.

Например, ионол в концентрации 0,005–0,02 % значительно повышает устойчивость соевого масла. При добавлении 0,01 % в подсолнечное масло срок его хранения возрастает в 1,6–1,8 раза. Использование того же антиоксиданта в жирах, предназначенных для кондитерской продукции, позволяет продлить срок их хранения до 150 суток без ухудшения качества. [82].

Радиопротекторы (синоним радиозащитные препараты) — это химические соединения, применяемые для ослабления вредного действия ионизирующей радиации на организм. Радиопротекторы используются лишь с целью профилактики и облегчают течение лучевой болезни. Введение радиопротекторов после облучения оказывается неэффективным. Условно радиопротекторы можно разбить на две группы: 1) радиопротекторы кратковременного, одномоментного действия, которые вводят в организм за короткий промежуток времени до облучения, и 2) радиопротекторы пролонгированного действия, которые вводят многократно, обычно небольшими дозами до лучевого воздействия.

Механизм радиозащитного действия радиопротекторов пролонгированного действия типа биогенных стимуляторов (например, витамины) связан с постепенным увеличением радиорезистентности организма и повышением активности компенсаторных и восстановительных процессов. Существенную роль при этом играет временное образование смешанно-дисульфидной связи между радиопротекторами и содержащими сульфгидрильную группу молекулами белков-ферментов. Предполагается, что в результате этого процесса окисляющие радикалы не поражают молекулы клеток.

Если антиокислителями обрабатываются опухолевые клетки мышей, они теряют способность к размножению, но при этом здоровые клетки ее не теряют,

а именно такая избирательность, как известно, необходима для успешной борьбы со злокачественными опухолями. Многообещающие результаты в этом отношении получены и с ионолом [83].

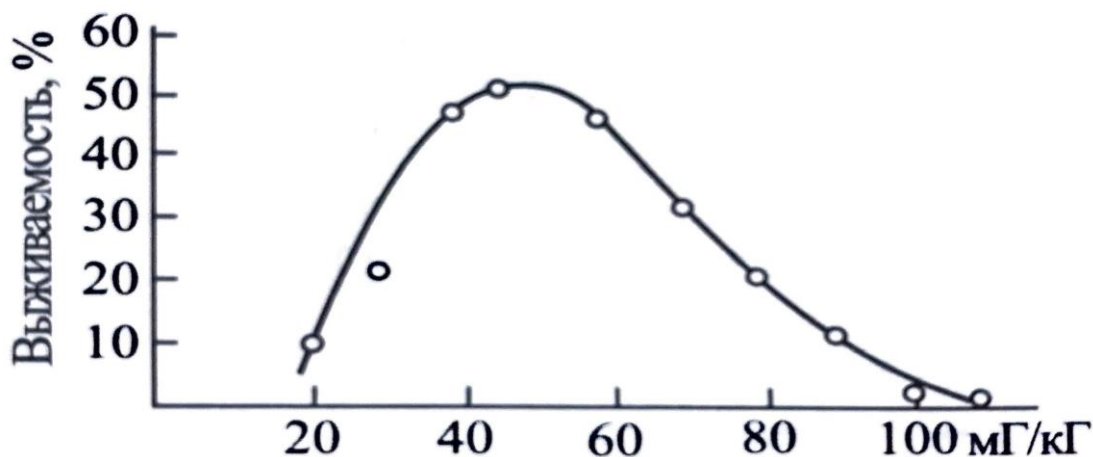


Рисунок 1.2.13 – Зависимость процента выживаемости облучения мышей линии BALB (доза облучения 550 Р) от количества введенного ингибитора (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола) [83]

Основной метаболит ионола – 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензойная кислота, которая в последующем конъюгируется с другими молекулами и выводится из организма. Введение радиоактивного ионола животным с последующим анализом распределения радиоактивности на тонкослойных хроматограммах липофильных фракций, полученных из разных органов в разные сроки после введения ионола, показало, что основная часть радиоактивности связана с нативным состоянием молекул. Это свидетельствует о быстром удалении окисленных и конъюгированных форм молекул ионола, но вместе с тем затрудняет определение эффективности его действия в организме.

1.2.3 Взаимодействие 2,6 –ди-*трет*-бутил-4-метилфенол(ионол) с АКМ

Относительно высокая антиокислительная активность ионола по сравнению с другими пространственно затрудненными фенолами объясняется его структурными особенностями. Строение *пара*-алкильного заместителя слабо влияет на величину константы скорости k_7 , поэтому все пространственно затрудненные фенолы характеризуются близкими значениями $k_7 \approx (3 \pm 1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

В таблице (таблица 1.2.2) представлены активные кислородные метаболиты.

Таблица 1.2.2 – Активные формы кислорода и родственные соединения [84]

Соединения	Название	Формула	Относительная активность
Радикалы	Супероксид-анион-радикал	$\text{O}_2^{\cdot-}$	0
	Пероксил-радикал	HO_2^{\cdot}	1
	Гидроксил-радикал	HO^{\cdot}	10^7
	Алкоксил-радикал	RO^{\cdot}	10^4
	Алкилпероксил-радикал	RO_2^{\cdot}	1
Нерадикалы	Пероксид водорода	H_2O_2	0
	Синглетный кислород	$^1\text{O}_2$	1
	Гипохлорит-анион	ClO^-	10^3
	Пероксинитритная кислота	ONOOH	10^2

Механизм антирадикального действия ионола, как и других пространственно затрудненных фенолов, хорошо описывается реакциями [15, 85]:



Характерные продукты взаимодействия ионола с некоторыми радикалами и синглетным кислородом представлены на рис. 1.2.14:

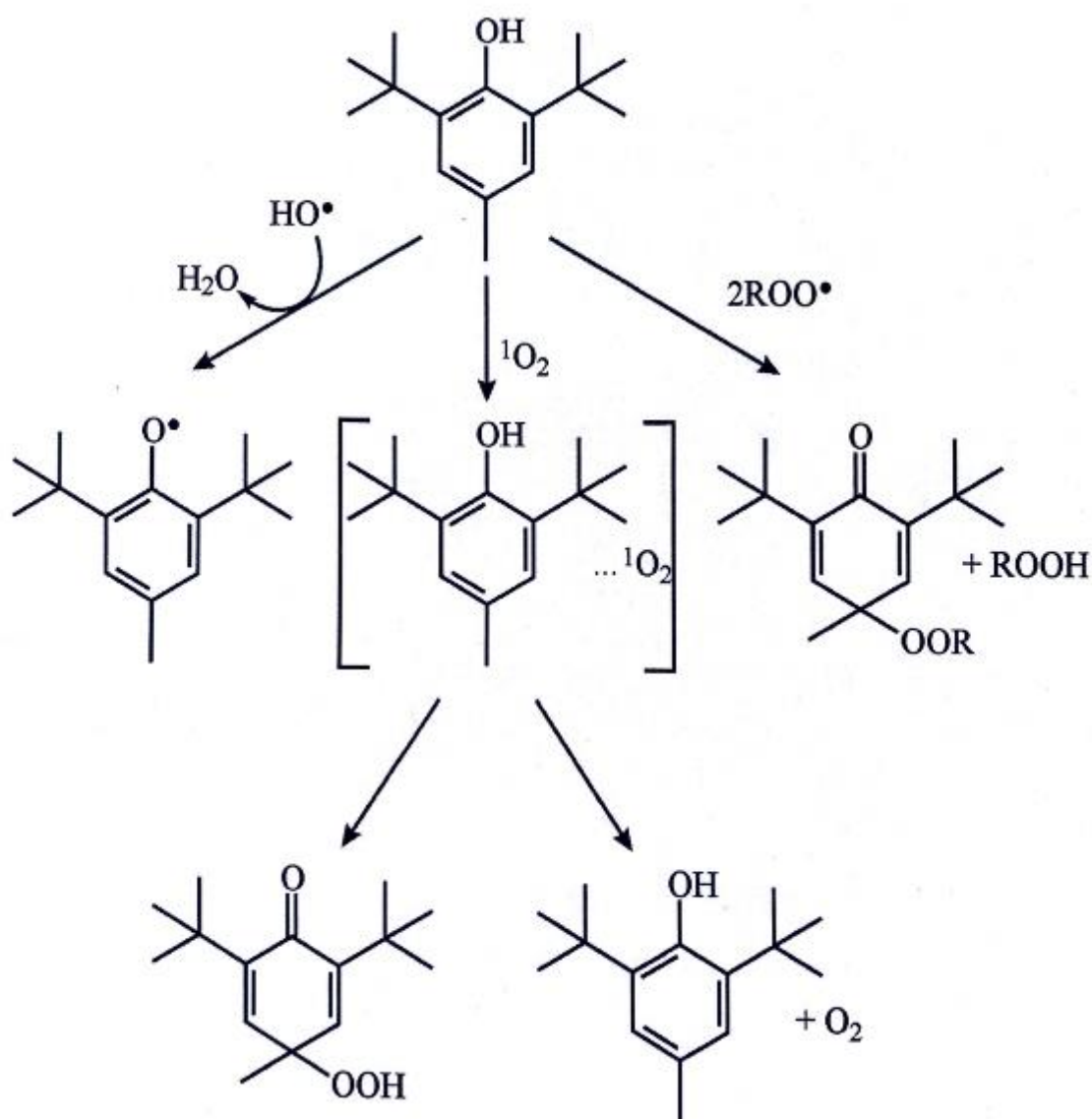
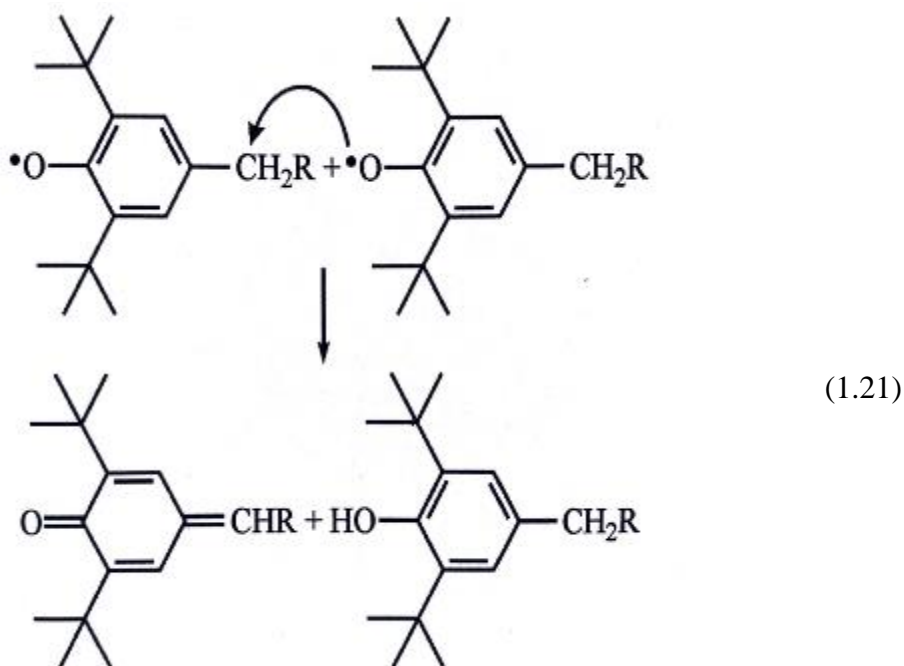


Рисунок 1.2.14 – Реакции ионола с АКМ

Энергия активации реакции феноксилов пероксидными радикалами, как правило, близка к нулю. В этой связи константы k_8 для пространственно затруднённых фенолов также изменяются в весьма узких пределах, они слабо зависят от природы PhO^\bullet и активного радикала RO_2^\bullet , и принимают обычно значения $\approx 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Таким образом, решающее значение для проявления различий в антиокислительной активности 2,6-ди-трет-бутил-4-алкилфенолов

имеет реактивность образуемых ими радикалов в реакции, которую принято считать основным путём гибели феноксильных радикалов в условиях свободнорадикального окисления низкой интенсивности (например, в отсутствие эффективного инициатора или при низкой температуре).

Реакция предполагает атаку одного феноксильного радикала по α -атому другим феноксилом:



При взаимодействии идиола с синглетным кислородом образуется промежуточный комплекс, который распадается по двум путям. В первом случае происходит внутримолекулярный перенос протона с образованием пероксида, во втором случае в результате тепловой релаксации спина комплекс распадается на молекулы идиола и кислорода в основных состояниях. Эффективность взаимодействия идиола с O_2 и выход продуктов сильно зависят от состояния среды, оценки показывают, что в биологических средах константа скорости данной реакции находятся в пределах $(0,1-5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (по данным - $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). По биологическим меркам идиол не является эффективным тушителем синглетного кислорода, т.к. в живых организмах достаточно много молекул, более активно взаимодействующих с $^1\text{O}_2$, - например, Р-каротин ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Основное преимущество ионола перед альфа-токоферолом и другими *орто*-метилзамещенными фенолами состоит в том, что ионол образует устойчивые радикалы, в то время как феноксила метилированных фенолов менее стабильны и могут участвовать в реакциях продолжения цепей окисления:



Ионол эффективно ингибировал окисление липидов в гомогенатах мозга крыс, индуцированное ионами железа с аскорбатом ($\text{IC}_{50} = 3,5 \text{ мкМ}$) или железо-аммонийными квасцами ($\text{IC}_{50} = 13 \text{ мкМ}$), одновременно он снижал в гомогенатах окислительную модификацию белков, которая определялась по активности креатинкиназы. Вызванное пероксинитритом окисление миелина также подавлялось ионолом, что проявлялось в снижении образования малонового диальдегида и изопростанов. В культуре моцитов крыс ионол угнетал апоптоз, индуцированный пероксинитритом. Одноэлектронный редокс-потенциал ионола составляет 600-700 мВ, соответственно, он уступает по восстановительной активности аскорбату (300 мВ), тролоксу (480 мВ) и цистеину (650 мВ), но превосходит триптофан (990 мВ). Поэтому в биологических системах ионол действует синергично с другими антиоксидантами; аскорбатом, цистеином, токоферолами.

Молекула ионола имеет в структуре фенольную часть $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$. В данном разделе представлены сведения о радиолизе фенола. Исследование радиолиза водных растворов фенола интересно не только с точки зрения очистки сточных вод [86], но и с точки зрения поведения фенола как модельного антиоксидантного соединения. Изучение радиолиза фенола рассмотрено в работах [87].

В качестве модельного соединения использовали водный раствор фенола. Исследовали радиолиз растворов фенола под действием γ -излучения ^{60}Co . Определяли убыль фенола, образование двухатомных фенолов и перекиси водорода, а также изменение pH раствора в зависимости от концентрации фенола

($5 \cdot 10^{-4} - 10^{-2}$ М), мощности дозы облучения ($4 \cdot 10^{13} - 1,5 \cdot 10^{16}$ зв/см³·сек) и наличия в системе кислорода. Обнаружено, что выход разложения фенола при облучении на воздухе резко увеличивается с ростом концентрации и уменьшением мощности дозы. В 10^{-4} М растворе при мощности дозы $2 \cdot 10^{15}$ зв/см³·сек выход разложения фенола составляет $3,0 \pm 0,4$ молек/100 эВ, в то же время 10^{-2} М растворе при мощности дозы $4 \cdot 10^{13}$ зв/см³·сек выход разложения достигает величины 250 ± 60 молек/100 эВ, т.е. в этих условиях эффективно протекает цепной распад фенола. Существенно, что цепной процесс протекает только при наличии в системе кислорода, т.е. в условиях окисления фенола.

Установлены стабильные продукты радиолиза $10^{-4} - 10^{-2}$ М растворов фенола на воздухе: пероксид водорода с радиационным выходом 1,2 молек/100 эВ, гидрохинон с выходом 2,0 – 4,0 молек/100 эВ, пирокатехин и резорцин с выходами 0,1 – 0,2 молек/100 эВ. При этом рН раствора изменяется от 6,5 до 5,0. В атмосфере гелия пероксид водорода не обнаруживается, выход гидрохинона весьма низок ($\sim 0,3$), рН раствора не изменяется.

Для растворов, насыщенных воздухом, при низких концентрациях раствора и высоких мощностях доз выход образования гидрохинона близок к выходу разложения фенола. Для $1,15 \cdot 10^{-4}$ М раствора при мощности дозы $(1,5 - 2,0) \cdot 10^{15}$ зв/см³·сек $G(-\text{фенол}) = 3,0 \pm 0,4$ и $G(\text{гидрохинон}) = 2,0 \pm 0,4$ молек/100 эВ. При увеличении концентрации фенола наблюдается очень большое расхождение между величинами выходов разложения фенола и образования гидрохинона. Так, в 10^{-2} М растворе $G(-\text{фенол}) = 20 \pm 2$ и $G(\text{гидрохинон}) = 4,1 \pm 0,6$ молек/100 эВ. При выходе разложения 250 молек/100 эВ расхождение еще больше. Это означает, что цепной процесс идет не в сторону образования гидрохинона, а по другому пути. На основании литературных данных [88] можно предполагать, что при радиолизе водных растворов фенолов происходит полимеризация с образованием смолообразных продуктов.

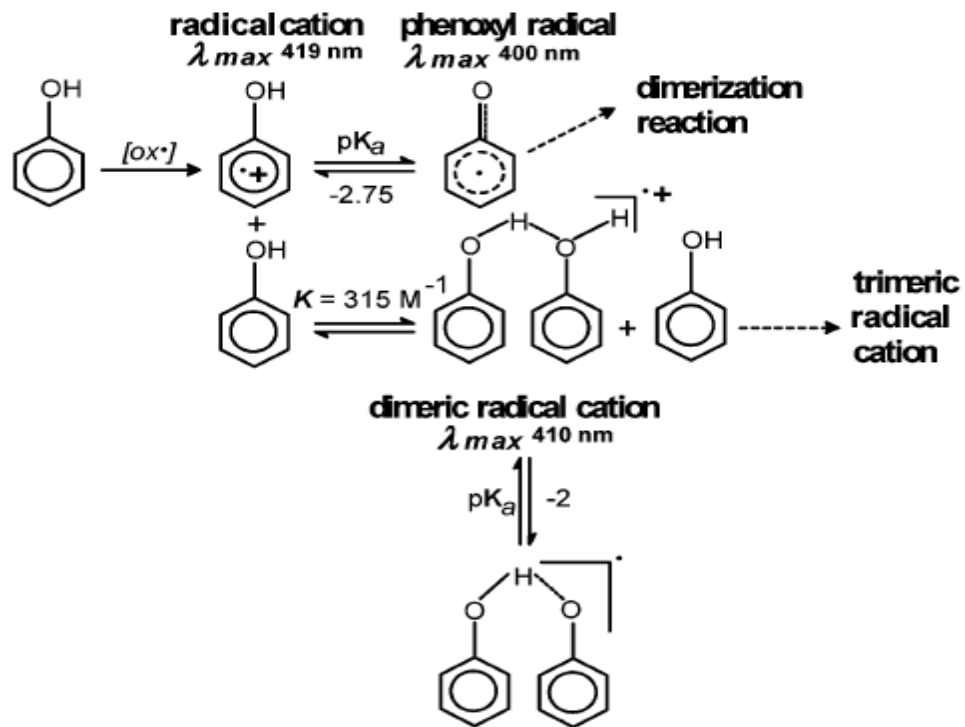


Рисунок 1.2.15 – Схема радиолиза фенола

1.3 Дрожжи как объекты исследования

Дрожжевые клетки рода *Saccharomyces*, в частности вид *Saccharomyces cerevisiae*, представляют собой одноклеточные грибы, обладающие широким спектром биологических и технологических свойств. В силу своей простоты, генетической доступности и высокой скорости роста, они являются важным объектом лабораторных исследований и основой для различных производственных процессов – от хлебопечения до синтеза рекомбинантных белков. Эти микроорганизмы относятся к эукариотам, и, соответственно, обладают развитым клеточным аппаратом: ядром, окружённым ядерной оболочкой, митохондриями, эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи. Клеточная стенка состоит в основном из глюканов, маннанов и хитина. Основной способ размножения *S. cerevisiae* – почкование, при котором на материнской клетке формируется дочерняя клетка. При неблагоприятных

условиях возможно вступление в половой процесс с образованием аскоспор. Жизненный цикл включает как диплоидную, так и гаплоидную стадии. Сахаромицеты способны как к аэробному дыханию, так и к анаэробному брожению. В условиях доступа кислорода глюкоза метаболизируется с образованием CO_2 и воды, тогда как в анаэробной среде происходит этанольное брожение с образованием этанола и CO_2 . Оптимальная температура роста – 28–32 °С, pH – в пределах 4.5–6.5. *S. cerevisiae* является одним из наиболее изученных организмов в молекулярной биологии. Они используются в исследованиях клеточного цикла, регуляции транскрипции, старения и апоптоза. Кроме того, данный вид дрожжей активно используется в биотехнологии: для производства хлеба, вина, пива, этанола, а также в качестве системы-хозяина для экспрессии гетерологичных белков (например, инсулина, ферментов, вакцинных антигенов). Изучение дрожжевых клеток осуществляется с помощью микроскопии (световой, электронной), культуральных методов, биохимических тестов, генно-инженерных подходов и современных молекулярно-генетических технологий (CRISPR/Cas, ПЦР, РНК-секвенирование и др.).

1.3.1 Строение, биохимические и молекулярно-биологические особенности дрожжей

Клетки *S. cerevisiae* имеют округлую, яйцевидную или эллипсоидную форму; размер их колеблется от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4,5 до 21 мкм в длину. Размер и форма клеток одного и того же штамма определяются генетически и могут варьироваться в определенных пределах в зависимости от условий культивирования и последующих операций получения коммерческих дрожжей (обезвоживание). Клетки состоят из микроскопических (видимых в обычном микроскопе при увеличении в 600–900 раз) и субмикроскопических, видимых только в электронном микроскопе (увеличение от 15–20 тыс. раз), структур. Эти структуры можно подразделить на постоянно присутствующие и

периодически обнаруживаемые в клетке. К первым относятся различные органеллы – клеточные структуры, выполняющие определенные функции. Это ядро с ядрышком, митохондрии, рибосомы, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум (сеть), аппарат Гольджи, лизосомы, хитосомы, гликосомы и целый ряд других мембранных структур (рис. 1.3.1). Все клеточные органеллы окружены мембранами. В состав мембран входит большое количество фосфолипидов, причем их содержание как в количественном, так и в качественном составе определяется природой органеллы [43].



Рисунок 1.3.1– Строение животной клетки

1.3.2 Механизм защиты от АФК дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

Известно [88], что активные формы кислорода (АФК), которые включают в себя H_2O_2 , O_3 , O , $\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO_2^{\bullet} , NO_2^- , NO , некоторые органические свободные радикалы: алкильные R^{\bullet} , алкилпероксидные RO_2^{\bullet} , алкоксильные RO^{\bullet} ,

анион-радикалы восстановительной природы $D^{\bullet-}$ и некоторые другие, образуются в результате реакций каталитического инициирования, растворения активных газов из атмосферы, радиации, кавитационного воздействия, фотооблучения, биологической эмиссии. Радиационное инициирование при отсутствии радиационного загрязнения водной среды осуществляется под воздействием естественного радиоактивного фона и происходит преимущественно в результате радиолиза воды [91]. В нормальных условиях вклад этого компонента в общую скорость образования радикалов незначителен, но резко возрастает при радиационном загрязнении. Солнечное УФ излучение иницирует образование свободных радикалов.

В клетках живого организма свободные радикалы выделяются в ходе естественного процесса обмена веществ и окислительно-восстановительных реакций [24]. Свободные радикалы [40] как нестабильные молекулы повреждают компоненты клеток, в частности ДНК и индуцируют системы стресс-ответа и репарации, включающие вещества-антиоксиданты, ферменты, механизмы изменения клеточной проницаемости [18, 92]. При нарушении баланса между реакциями с участием АФК и системами стресс-ответа развивается состояние оксидативного стресса, которое является одним из наиболее физиологически значимых, опосредующих другие виды стрессов [93]. В таком состоянии наблюдается резкое усиление окислительных процессов, интенсифицируются реакции перекисного и радикального окисления, возрастает содержание веществ с прооксидантной активностью при недостаточности системы антиоксидантной защиты [15], нейтрализации образующихся АФК, метаболизм перестраивается на синтез белков, необходимых для выживания. Размножение микроорганизмов в состоянии оксидативного стресса замедляется и прекращается. Увеличение диффузии кислорода в клетку или нарушение функционирования дыхательной цепи приводят к повышению внутриклеточной концентрации АФК в 100–1000 раз, до 10^{-5} М и более. Все это неблагоприятно влияет на клетки и клеточные популяции.

Наряду с прямым химическим и фотохимическим воздействием АФК, прежде всего H_2O_2 , участвуют во внутриклеточных процессах и передаче регуляторных сигналов в прокариотических и эукариотических клетках [94], изменяют редокс-состояние среды в клеточных органеллах, участвуют в гормональной регуляции и в других метаболических перестройках.

Обычно наблюдаются совместные воздействия стрессоров и антистрессоров различной природы, а применительно к воздействию АФК – воздействие прооксидантов и антиоксидантов [15, 48, 95] в качестве которых могут выступать одни и те же соединения. В природных условиях такая ситуация характерна на освещенных солнечным светом поверхностях воды, почвы, растений, где в результате фотохимического воздействия ультрафиолета образуются H_2O_2 и другие активные формы кислорода, частицы радикалов, локальные зоны с повышенной температурой, индуцирующие у различных организмов реакции ответа на оксидативный стресс и тепловой шок. Одновременно на клетки воздействует ближний ультрафиолет (УФА и УФБ диапазонов) и видимый свет. Последний может участвовать в нейтрализации негативных изменений через механизмы фоторепарации и перекрестные реакции.

Дрожжи *S. carlsbergensis* являются факультативными анаэробами, при недостатке кислорода в среде они имеют способность к сбраживанию сахара, а при избытке кислорода – к окислению сахара.

Скорость потребления глюкозы в дрожжах этого вида достигает 100–300 мкмоль/ч, а кислород потребляется со скоростью всего 5–50 мкмоль/ч. Интересно отметить, что в штаммах *S. carlsbergensis* обнаружена малая скорость потребления кислорода.

Дрожжи *S. carlsbergensis* характеризуются низкой скоростью роста на глюкозосодержащих средах. При этом существенная разница в потреблении кислорода в зависимости от его наличия в среде не наблюдается. При избытке сахара и источников азота, а также при соблюдении нормальных условий роста, эффект Пастера не проявляется.

Наличие в среде сахара (выше 15%) и соли (выше 1–1,5%) негативно сказывается на жизнедеятельность дрожжей. Этанол в концентрации 2–5% также замедляет развитие. При наличии в среде 12–14% этанол, жизнедеятельность дрожжей в большинстве случаев останавливается.

При ДНК-гибридизации *S. carlsbergensis* обнаруживается сходство с *S. cerevisiae* (57%) и с *S. bayanus* (72%). Предполагается, что *S. carlsbergensis* является частичным амфидиплоидом, который может возникать при естественной гибридизации *S. cerevisiae* и *S. bayanus*.

Размножаются *S. carlsbergensis* вегетативным или половым путем. Температура 25 °С является наиболее предпочтительной. Половое размножение осуществляется в результате мейотического деления диплоидного ядра дрожжей. Во время этого процесса образуются аскоспоры и споридии, называемые гаплоидными спорами. На процесс аскообразования влияет ряд факторов. Стадия развития вегетативной клетки напрямую влияет на способность к споруляции: клетки, взятые в середине вегетативного клеточного цикла спорулируют быстрее, чем только что образованные клетки. Высокая интенсивность споруляции клетки наступает в последней трети клеточного цикла. Дочерние клетки спорулируют хуже, чем материнские. Предварительная адаптация к метаболизму служит предпосылкой для максимальной споруляции клетки.

Вегетативное размножение у *S. carlsbergensis* осуществляется за счет образование почек на материнской клетке, то есть так называемого многостороннего почкования. Во время этого процесса в клетке образуется небольшой бугорок – почка. В процессе роста дочерней клетки перепонка, связывающая ее с материнской клеткой, исчезает, и примерно через 2 часа молодая клетка отсоединяется от старой. Порой в неблагоприятных условиях случается так, что молодые клетки не отделяются от материнской, и образуются несколько почек. Количество почкований в течение жизни одной клетки равняется 25–30.

1.4 Влияние различных стресс-факторов на дрожжевые клетки

Дрожжевые клетки, как и все живые организмы, подвергаются воздействию различных стресс-факторов, способных вызывать серьёзные изменения в их физиологии, метаболизме и жизнеспособности. В ответ на стресс дрожжи активируют защитные механизмы, направленные на сохранение клеточной структуры и функций [92].

Одним из наиболее значимых факторов является температурный стресс. Повышение температуры приводит к денатурации белков, нарушению целостности мембран и накоплению активных форм кислорода (АФК), тогда как понижение температуры вызывает замедление метаболических процессов и риск образования внутриклеточных кристаллов льда. В ответ на температурные колебания дрожжевые клетки усиливают синтез белков теплового шока (HSPs) и модифицируют липидный состав мембран, что позволяет стабилизировать их структуру.

Осмотический стресс возникает при резких изменениях внешней осмолярности среды, что приводит к потере воды из клетки или её избыточному поступлению. Для противодействия этому дрожжи накапливают осмопротекторы, такие как глицерин, и перестраивают метаболические пути для поддержания клеточного гомеостаза.

Окислительный стресс связан с избытком активных форм кислорода, которые повреждают белки, липиды и нуклеиновые кислоты. В ответ дрожжи активируют антиоксидантные системы, включая ферменты каталаза и супероксиддисмутаза, а также механизмы репарации повреждённых молекул.

Кислотно-щелочной стресс возникает при изменении pH окружающей среды. Такие изменения могут нарушать ферментативные процессы и проницаемость мембран. Для выживания в этих условиях дрожжи регулируют работу ионных насосов, изменяют экспрессию определённых генов и синтезируют буферные соединения, поддерживающие внутренний pH на оптимальном уровне.

Этанольный стресс особенно актуален для дрожжей, используемых в процессе брожения. Этанол повреждает клеточные мембраны и белковые структуры. В ответ клетки усиливают синтез шаперонов, изменяют состав мембранных липидов и активируют системы детоксикации.

Наконец, нутритивный стресс, связанный с дефицитом питательных веществ, таких как углерод, азот, сера или фосфор, заставляет дрожжи переходить в стадию стационарной фазы. В этих условиях активируются процессы аутофагии, усиливается накопление запасных веществ, таких как гликоген и триглицериды.

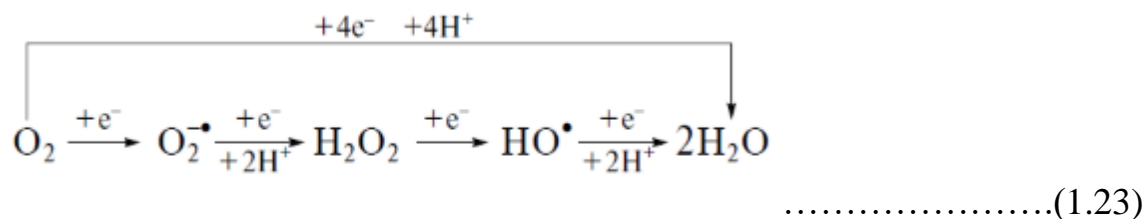
Таким образом, дрожжевые клетки обладают широким спектром адаптивных реакций на различные стресс-факторы, что обеспечивает их выживание в неблагоприятных условиях окружающей среды.

1.4.1 Места и пути образования свободных радикалов

Молекула кислорода, благодаря своему строению, способна последовательно присоединять электроны или протоны от соединений-доноров. Этот процесс может реализовываться двумя путями: либо через механизмы, основанные на работе ферментов, либо в результате неферментативных взаимодействий, инициируемых химическими агентами или внешними физическими воздействиями:

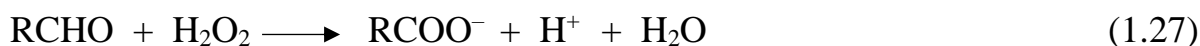
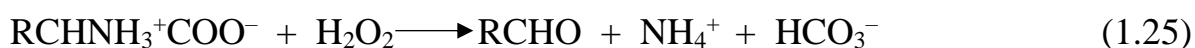
1. В аэробных клетках, наряду с полным восстановлением молекулы кислорода (O_2) до воды, которое сопровождается переносом четырех электронов, неизбежно протекает и неполное восстановление. Этот процесс представляет собой поэтапное присоединение одного-трех электронов, который приводит к образованию активированных форм кислорода (АФК). Самым первым образуется супероксид анион-радикал (O_2^-), который затем преобразуется в пероксид водорода (H_2O_2). В конце реакции (1.23) возникает гидроксильный радикал ($HO\bullet$) – обладающий наибольшей активностью из АФК (см. реакцию

1.23). Эти соединения, являясь побочными продуктами клеточного дыхания, играют ключевую роль в окислительном стрессе [96].



2. Несмотря на то, что АФК могут формироваться в любой из частей клетки, самое большое количество образуется в митохондриях – в комплексах I и III дыхательной цепи. Получившиеся в гидрофобной области формы АФК являются наиболее опасными, так как становятся причиной перекисного окисления липидов, приводящее к разрушению ДНК митохондрий (мДНК) [97].

3. В общем и целом, от АФК способны пострадать все компоненты клеточной системы, например, их взаимодействие с аминокислотами могут привести к образованию: аммония (NH_4^+), α -кетокислоты (реакция 1.24) или альдегидов и углекислого газа (CO_2) (реакция 1.25). Дальнейшее развитие этих процессов (реакции 1.26, 1.27) приводит к синтезу карбоновых кислот, характеризующихся укороченной углеродной цепью – количество атомов углерода в них уменьшается на единицу по сравнению с исходными соединениями [98].



4. При окислительном стрессе происходят структурные изменения ДНК в её углеводном части, вызываемые HO^{\bullet} . Эти повреждения нарушают последовательность генетического кода, тем самым, провоцируя накопление

мутаций, которые будут сохраняться и передаваться в процессе клеточного деления. В результате организм столкнется с возрастанием генетических ошибок, влияющих на его функции и устойчивость к внешним факторам. Критическая концентрация АФК способна вызывать апоптоз клеток, что можно рассмотреть, как благоприятный исход, так как предотвращается гибель организма от образования злокачественных соединений [99-101].

1.4.2 Системы защиты от окислительного стресса в клетке и антиоксидантная система у дрожжей *S. cerevisiae*

Окислительный стресс возникает, в результате неспособности антиоксидантной защиты нейтрализовать молекулы АФК. Это состояние развивается при чрезмерном образовании свободных радикалов. Если организм ослаб, находится в состоянии стресса и не способен утилизировать то чрезмерное количество образовавшихся АФК, они начинают накапливаться и постепенно влиять на ключевые биологические молекулы: липиды мембран, белки, нуклеиновые кислоты и прочие элементы структуры, что влечет за собой повреждение клеточных структур, и следствием будет нарушение функционирования всего организма.

Таким образом, окислительный стресс представляет собой не просто временное, а системное нарушение равновесия, при котором окислительные реакции преобладают над восстановительными механизмами, создавая предпосылки для структурно-функциональных дефектов на молекулярном и клеточном уровнях.

Антиоксидантная защита представляет собой сложную сеть, взаимодействующих между собой и с прооксидантами компонентов, включающую как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные соединения. Одна из её особенностей – наличие компонентов, способных не только нейтрализовать прооксиданты, но и, в зависимости от концентрации,

локализации и физико-химических свойств среды, самим проявлять окислительные свойства. Эта двойственность затрудняет чёткое разделение про- и антиоксидантных функций, делая систему гибкой, но уязвимой к нарушению равновесия. Традиционно антиоксидантами называют соединения, препятствующие окислению биомолекул. Однако такое определение полностью не отражает многообразие защитных механизмов. Например, к антиоксидантным системам не относят вещества, подавляющие синтез АФК, или соединения, перенаправляющие электроны по альтернативным путям, что снижает вероятность образования свободных радикалов [9, 18, 24].

В современной классификации антиоксидантов, учитывающей механизмы реакции и размер молекул, выделяют:

1. Ферменты, задача которых – нейтрализовать АФК (преобразовывать радикалы в менее активные формы). Примером таких ферментов может служить: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидазы, преобразующие радикалы в менее реактивные формы.

2. Ферменты-детоксиканты. В качестве примера можно привести Глутатион-S-трансферазы, которые способны временно присоединять глутатион к определённым участкам белков (цистеиновым группам), легко вступающих в химические реакции. Это обратимое связывание выполняет две функции: регулирование активности и защищает от окисления (предотвращает необратимые повреждения этих участков, сохраняя возможность вернуть белку исходную конформацию после прекращения действия стрессового фактора). Таким образом, процесс работает как «предохранитель», позволяя клетке восстанавливать белки после окислительных повреждений.

3. Низкомолекулярные. Под данную категорию подходят глутатион, витамин С, каротиноиды, непосредственно взаимодействующие со свободными радикалами.

4. Регенерационные ферменты – система глутатионредуктаз и ферментов, восстанавливающих активные формы антиоксидантов. Отдельную роль играют соединения с опосредованным антиоксидантным действием, такие как пролин и

сахара. Хотя их основная функция не связана с защитой от окисления, при стрессе их концентрация резко возрастает, что косвенно стабилизирует клеточные структуры и подавляет радикальные реакции. Эта многоуровневая организация позволяет адаптировать антиоксидантную систему к изменяющимся условиям, однако её эффективность зависит от слаженной работы всех компонентов [102, 103, 105].

5. Один из типов антиоксидантной системы у грибов представлен ферментами первой линии (ФПЛ). ФПЛ являются супероксиддисмутаза (СОД) и каталазы [103-106]. Одно из преимуществ СОД в том, что они обладают высокой избирательностью к АФК, обусловленной наличием в активных центрах металлов (медь, цинк, марганец, железо, селен), способных менять степень окисления.

Mn-СОД обладает ключевой особенностью – высокой устойчивостью к перекиси водорода, что позволяет поддерживать стабильную работу ферментов первой линии антиоксидантной защиты в митохондриях даже в условиях окислительного стресса. Работоспособность этого фермента подтверждается данными: под действием ионизирующей радиации скорость транскрипции его мРНК увеличивается в 2 раза, а стабильность молекулы – в 3 раза. У дрожжей *S. cerevisiae* при окислительном стрессе и переходе в стационарную фазу роста наблюдается усиленная экспрессия как *Cu/Zn-СОД*, так и *Mn-СОД*. Повышение активности генов, кодирующих обе формы фермента, коррелирует с увеличением продолжительности жизни клеток и их устойчивости к повреждающим эффектам окислительного стресса.

Каталазы, в свою очередь отвечают за катализ пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды. *S. cerevisiae* в своем геноме содержит два типа. Первый находится в пероксисомах – это А (СТА1), второй в цитоплазме – Т (СТТ1).

Следующая группа ферментов включает в себя глутатионпероксидазы (ГПД), которые восстанавливают пероксид водорода до воды. Но их основная задача не восстановить, а почувствовать появление пероксида водорода и

передать сигнал о начале антиоксидантной защиты. При этом данные организмы экспрессируют селено-независимые глутатионпероксидазы (NS-Gpx), в активном центре которых селеноцистеин (Se-Cys) замещен цистеином. Дрожжи относятся к группе фосфолипид-гидропероксидных ГПД (ФЛГПД), способных напрямую восстанавливать гидроперекиси фосфолипидов [105-108].

Еще одна группа ферментов – глутатионредуктаза и AKR1B1 (или альдозоредуктаза). Это совокупность нескольких ферментов, преобразующих органические соединения (сахара, стероиды, токсичные альдегиды, ароматические вещества) с помощью коферментов НАДФН или НАДН с целью предотвращения действия опасных альдегидов, возникающих при окислительном стрессе (например, продукты распадов липидов) и снижения концентрации высокореактивных молекул, образующихся при окислении жиров, что уменьшает риск разрушения клеточных структур. Таким образом, она поддерживает стабильность клеток в условиях стресса.

Также, среди антиоксидантных систем грибов можно рассмотреть альтернативную оксидазу.

Таким образом, в биологических системах существует уникальный механизм контроля – антиоксидантная система регуляции, где окислительно-восстановительные реакции служат своего рода «переключателями» для активации или подавления конкретных функций. Например, умеренное повышение уровня активных форм кислорода (АФК) может, например, стимулировать выработку цитокинов (сигнальные белки), тогда как их избыток запускает программу клеточной гибели. Эта система демонстрирует, как химическая природа молекул определяет их роль в поддержании гомеостаза, объединяя биохимию с клеточной биологией [105-108].

1.4.3 Ионизирующее излучение и его биологическое действие на микроорганизмы

Ионизирующее излучение (ИИ) представляет собой часть широкого электромагнитного спектра. Оно может иметь природное происхождение или создаваться искусственными источниками в результате деятельности человека.

Ионизирующим называется такое излучение, которое при прохождении через вещество вызывает возбуждение его атомов и выбивание электронов с внешних оболочек. В состав ИИ входят электромагнитное и корпускулярное (частицы) излучения.

Классификация ионизирующего излучения

1. По энергетической составляющей:

- моноэнергетическое — состоит из частиц одного типа с одинаковой энергией;
- немонаэнергетическое — состоит из частиц одного типа, но с разной энергией.

2. По характеру распространения:

- направленное;
- ненаправленное.

3. По типу ионизации:

- непосредственно ионизирующее — состоит из заряженных частиц, кинетическая энергия которых достаточна для ионизации атомов при столкновении. Примеры: α - и β -излучение радионуклидов, протонное излучение ускорителей;

- косвенно ионизирующее — состоит из незаряженных частиц, которые при взаимодействии со средой порождают заряженные частицы, уже способные непосредственно вызывать ионизацию. Примеры: нейтронное и фотонное (электромагнитное ионизирующее) излучение [8, 109, 110].

В настоящее время существуют взаимодополняющие друг друга механизмы действия ионизирующего излучения на живой организм – прямого и

косвенного действия радиации. Суть механизма прямого действия сводится к тому, что все виды радиации вызывают ионизацию и возбуждение атомов клеток живого организма. Конкретные механизмы ионизации различных атомов в зависимости от вида облучения подробно рассмотрены нами раньше. Однако механизмы прямого действия не могут полностью объяснить изменение ряда физиологических процессов, связанных с облучением организма, в частности, несоответствие между фазой облучения и наблюдаемым биологическим эффектом. Действительно, при облучении живого организма в биологической ткани происходят сложные физические, химические и биологические процессы. Действие радиации на биологическую ткань является, по-видимому, не прямым (косвенным) [111].

В радиобиологии к малым дозам традиционно относят диапазон от сГр до Гр. Однако для дрожжей эти значения остаются условными, и термин часто требует дополнительных объяснений. Исследования обычно фокусируются на анализе состояния непосредственно облучённых клеток, тогда как их потомство редко становится объектом пристального внимания. Жизнеспособность клеток определяется их способностью формировать макроколонии – видимые скопления на питательной среде. Отсутствие таких колоний интерпретируется как гибель, однако остается неясным, прекращают ли существование непосредственно облученные клетки или их первые поколения.

Даже при полной выживаемости популяции облучение вызывает обратимые нарушения в процессе почкования, которые наблюдаются у ближайшего потомства. Например, γ -излучение в дозах 1,0–5,0 Гр провоцирует генетические повреждения. Эти изменения могут сохраняться в поколениях, влияя на жизнеспособность клеточной линии. В течение первых 4–8 часов после облучения отмечается появление аномальных микроколоний, разнообразие которых, вероятно, связано с неравномерным распределением повреждений в клеточной популяции. Существует гипотеза, что эти первичные нарушения запускают каскад вторичных эффектов, проявляющихся у отдаленных потомков.

Небольшие дозы ИИ, не приводя к немедленной гибели клеток, способны провоцировать долгосрочные биологические изменения. Это подчеркивает необходимость комплексного изучения как непосредственных, так и отложенных последствий облучения на уровне клеточных популяций и их генетического аппарата [112-115].

Помимо этого, проводились исследования, изучающие влияние каких-либо факторов, несущих положительный эффект на микроорганизм. Было обнаружено, что для дрожжей имеет место быть такое явление – фотореактивация. Оно заключается в восстановлении активности и ДНК клеток [116].

1.4.4 Взаимосвязь ионизирующего излучения и окислительного стресса

При воздействии ИИ на биологические структуры энергия поглощается, запуская каскад биохимических реакций. Это приводит к радиолизу молекул воды и органических веществ, сопровождающемуся генерацией свободных радикалов. В присутствии кислорода эти процессы способствуют накоплению (АФК) – супероксид-анионов, пероксидов и других окислителей в митохондриях. АФК способствуют активации сигнального каскада, опосредованный белком p53, который выполняет роль регулятора воспалительных процессов. В результате усиливается экспрессия генов, ассоциированных с окислительным метаболизмом, и стимулируется продукция провоспалительных цитокинов. Данные соединения инициируют цепные реакции, нарушающие клеточный метаболизм и провоцирующие окислительный стресс, что лежит в основе радиационного поражения тканей.

В результате воздействия радиации на клеточные мембраны происходит их повреждение, что приводит к высвобождению: аминов и антигенов. А также: повреждённую ядерную и митохондриальную ДНК, внеклеточный АТФ и окисленные липопротеиды низкой плотности. Через активацию рецепторов эти

компоненты запускают стресс-сигнальные механизмы, что способствует развитию воспалительных реакций на поражённых участках [117].

1.4.5 Области применения в промышленности адаптированных линий

Дрожжи сами по себе пользуются большой популярностью в промышленности. Благодаря уникальным свойствам, а именно устойчивости к внешним воздействиям. Они быстро размножаются и не представляют угрозы для человека, так как их геном лишен последовательностей, кодирующих опасные токсины или вирусы.

Важное преимущество этих организмов – простота генетических модификаций. Внедрение чужеродной ДНК в их клетки происходит с высокой точностью за счет механизмов гомологичной рекомбинации, что позволяет целенаправленно изменять геном.

Именно поэтому *S. cerevisiae* (пекарские дрожжи) стали ключевым инструментом для синтеза рекомбинантных белков, используемых в производстве лекарств, ферментов и других биологически активных соединений [118, 119]. Что касается адаптированных к окислительному стрессу линий микроорганизмов, то они, согласно исследованиям [113, 120], характеризуют более высокую устойчивость и продолжительность жизни. Данные линии способны не только выживать в экстремальных условиях, но выделять гораздо больше метаболитов, чем неадаптированные, например, в ходе эксперимента [121] было установлено, что адаптированные линии дрожжей способны образовывать почти на 20% больше сырого протеина, который в последствии может использоваться в качестве добавки для кормов животных [122-124]. К тому же, дрожжи *S. cerevisiae* с повышенной экспрессией Mn-SOD и Cu/Zn-SOD синтезируют ферменты для БАДов и препаратов против окислительного стресса [125], а также исследование Т.А. Ямашаева и О.А. Решетник [126] выявило, что предварительная обработка дрожжей *S. cerevisiae* нелетальными концентрациями пероксида водорода (0,5–3,0 мМ) повышает их устойчивость к

молочной кислоте. В стрессовых условиях (2% раствор молочной кислоты) такие клетки сохраняли значительно более высокую бродильную активность по сравнению с неадаптированным контролем. Помимо всего прочего, данные, полученные на модельных микроорганизмах, расширяют представления об аналогичных процессах у высших организмов, включая человека, где дисбаланс в этой системе лежит в основе старения, нейродегенеративных и онкологических заболеваний [127].

1.4.6 Действие рентгеновского излучения на дрожжи р. *Saccharomyces*

Действие ионизирующего излучения (ИИ) на организм определяется несколькими факторами, среди которых главными являются: тип излучения, полученная доза, площадь облучённой поверхности и продолжительность облучения. В зависимости от возможных негативных последствий различают детерминированные и стохастические эффекты дозового воздействия [128].

Инактивация молекулы может происходить двумя путями: прямым или косвенным (опосредованным). При прямом действии инактивируются те молекулы, которые сами поглотили энергию излучения. Непрямое действие имеет место, когда молекула поражается активными продуктами, образовавшимися в результате поглощения энергии её микроокружением.

В механизме повреждающего действия ИИ на организм условно выделяют три этапа:

1. первичное действие ионизирующего излучения;
2. влияние радиации на клетки;
3. действие радиации на целостный организм.

При оценке биологических последствий облучения их целесообразно разделять на летальные (возникают при высоких дозах) и сублетальные (нелетальные, наблюдаемые при малых и средних дозах). [129] На уровне клетки

и субклеточных структур ИИ вызывают различные реакции: от временной задержки деления клеток до их гибели.

В клетках функционируют сложный комплекс ферментных систем, поддерживающих структурную целостность генома. К одной из них относят разнообразные ферменты репарации ДНК, распознающие дефекты ее структуры, «ремонтующие» ее при лучевых повреждениях путем специфического устранения различных повреждений и восстановления структуры и функции ДНК, а вместе с тем и нормального клеточного деления [130]. Радиационные повреждения клеток вызывают необратимые нарушения ультраструктуры органелл, что, в свою очередь, приводит к изменениям обмена веществ. Повреждение цитоплазматических структур ионизирующим излучением (ИИ) проявляется в виде нарушений энергетического обеспечения клеток и проницаемости их мембран, что ведёт к гибели клеток.

При воздействии ИИ на клеточное ядро наблюдается замедление синтеза ДНК, возникают одностранные и двустранные разрывы, приводящие к хромосомным абберациям, а также появляются генные мутации. Повреждение ядра вызывает синтез изменённых белков. Наиболее опасными с точки зрения последствий являются повреждения генома клетки и хромосомного аппарата, поскольку они нарушают механизм митоза [130].

При облучении клетки «большими» дозами ИИ в ней развиваются необратимые изменения, которые могут привести к одному из трёх исходов: гибели до вступления в митоз (интерфазная гибель) либо к гибели в момент митотического деления (митотическая репродуктивная гибель). Основная причина репродуктивной гибели клеток — структурные повреждения ДНК, возникающие под действием облучения. Гибель клеток ведёт к нарушению структуры тканей, их опустошению и потере функций. Полное подавление митоза наступает после воздействия большими дозами ИИ: клетка ещё долгое время остаётся живой, но необратимо утрачивает способность к делению. В результате облучения формируются патологические формы клеток — например,

гигантские клетки, содержащие несколько наборов хромосом [130].



Рисунок 1.4.1 – Механизмы патогенного действия ионизирующего излучения

Когда гаплоидные дрожжевые клетки подвергаются воздействию рентгеновских лучей в анаэробных условиях, их кривая выживаемости остается экспоненциальной, как и при облучении клеток на воздухе. При комнатной температуре для дрожжевых клеток, облученных анаэробно, коэффициент снижения дозы составляет примерно два по сравнению с клетками, облученными на воздухе. Защита достигается, если клетки остаются анаэробными за несколько минут до и во время воздействия рентгеновских лучей. Анаэробный рост в течение нескольких дней до или после облучения не приводит к дальнейшему изменению радиационной чувствительности или формы кривой выживаемости.

1.4.7 Процессы восстановления в облученном микроорганизме и репарация ДНК

Связь между восстановлением после потенциально летальных и сублетальных повреждений, наблюдаемым на клеточном уровне, и повреждением ДНК можно представить следующим образом: часть повреждений ДНК настолько серьёзна, что клетка не сможет пройти несколько необходимых для её жизнеспособности делений, независимо от доступного времени для восстановительных процессов. Часть поражений, вероятно, репарируется достаточно быстро ферментативными системами, действующими в обычном режиме. Благодаря этому часть клеток после облучения вступает в деление в обычное время, производя клоногенное потомство. У других клеток поражения элиминируются благодаря удлинению цикла, наступающему при обнаружении поражений во время прохождения клеткой чекпойнтов. Феноменологически это выглядит в виде задержки митозов, возрастающей с увеличением дозы излучения. Если клетка в момент облучения находится вне цикла, то у нее больше возможностей для восстановления, чем у клетки, активно реплицирующей ДНК и готовящейся к митозу. Поэтому клетки в стационарной фазе роста, независимо оттого, находятся ли они там из-за дефицита питательных веществ или из-за контактного ингибирования (скорость прохождения цикла уменьшается даже у опухолевых клеток после того, как они покрывают всю поверхность культурального сосуда, хотя у них контактное ингибирование выражено несоизмеримо слабее, чем у клеток нормальных тканей) имеют больше времени для репарации потенциальных леталей. Если после облучения клетки сразу пересеять, поместив их на хорошую питательную среду и дав им место для размножения, то они не успеют репарировать повреждения ДНК до начала быстрого продвижения по циклу и погибнут. Если их пересеять через несколько часов после облучения, то их клоногенность возрастет. Это – эффект восстановления от потенциально летальных поражений.

Часть нанесенных повреждений ДНК не влияет на выживание клетки и подвергается удалению в процессе ее нормальной жизнедеятельности [126].

Восстановление организма после острого лучевого поражения в первом приближении можно свести к пролиферации клеток, сохранивших жизнеспособность, благодаря чему восполняется убыль популяции клеток критических органов и систем, а следовательно, восстанавливается их функциональная полноценность.

Источником пострадиационного восстановления критических тканей и органов могут быть не только неповрежденные клетки, но и клетки, поврежденные обратимо и восстановившие жизнеспособность, точнее, способность к неограниченному размножению.

В любой облученной клеточной популяции следует различать два типа пострадиационного восстановления: репарация на клеточном уровне и восстановление на популяционном уровне.

Пострадиационное восстановление – ликвидация повреждения, вызванного воздействием ионизирующего излучения. Пострадиационное восстановление (ПВ) проявляется на различных уровнях биологической организации от молекулярного до организменного. В его основе лежат физиологические процессы, направленные на обеспечение стабильности генетического материала и клеточного обновления жизненно важных систем. ПВ, протекающие в облученных клетках без их деления (внутриклеточное восстановление), обозначают термином «репарация». В клетках облученного микроорганизма происходит репарация сублетальных и потенциально летальных повреждений. Репарация сублетальных повреждений характерна для активно пролиферирующих клеток. При таком типе ПВ в первые несколько часов после облучения репарируются повреждения, делающие клетку более чувствительной к повторному облучению. Репарация сублетальных повреждений обычно бывает полной и завершается до вступления облученных клеток в период синтеза ДНК [130].

Репарация потенциально летальных повреждений характерна для клеток, находящихся в фазе временного или постоянного пролиферативного покоя. В этом случае выживаемость клеток возрастает с увеличением временного интервала между облучением и воздействием стимула к клеточной пролиферации или при снижении мощности дозы излучения. Репарация потенциально летальных повреждений обычно не является полной, часть популяции представляют клетки, потерявшие способность к «бесконечному» размножению и отмирающие после одного или нескольких делений.

Многообразие процессов обусловлено как многочисленностью возникающих радиационных повреждений, так и использованием различных показателей – повреждений ДНК, хромосом и целых клеток. Кроме того, доказано, что различные репаративные процессы, разделенные по скорости их молекулярных проявлений, протекают параллельно. Соответствующие типы репарации могут быть полностью или частично завершенными; кроме того, в ряде случаев репарация протекает как «ошибочная». Доказан генетический контроль различных этапов репаративных процессов. В процессах репарации принимают участие многочисленные ферменты – ДНК-полимеразы, рестриктазы, лигазы и др. На клеточном уровне может быть восстановлена большая часть повреждений молекул-мишеней [131].

1.4.8 Влияние стрессовых воздействий: этанола, H₂O₂ и различных химических добавок (амины, нафталин и другие) на выживаемость дрожжевых клеток

Дрожжевые клетки, такие как *S. cerevisiae*, широко используются в биотехнологии, пищевой промышленности и фундаментальных исследованиях. Их выживаемость в стрессовых условиях, вызванных химическими агентами, критически важна для оптимизации производственных процессов. В данной работе рассматривается влияние этанола, перекиси водорода (H₂O₂) и аминов на

жизнеспособность дрожжей, а также потенциальные механизмы их взаимодействия.

Этанол — продукт анаэробного брожения дрожжей, однако его накопление в среде оказывает дозозависимый токсический эффект:

- Механизмы токсичности:

- Нарушение целостности клеточных мембран за счет растворения липидов.

- Денатурация белков, ведущая к дисфункции ферментов (например, алкогольдегидрогеназы).

- Индукция окислительного стресса через генерацию реактивных форм кислорода (РОС).

- Критические концентрации:

При 8–10% (об./об.) наблюдается подавление роста, а при >15% — гибель клеток.

- Адаптация:

Дрожжи активируют стрессовые ответы (HSP-белки, осмозащитные механизмы), но длительная экспозиция приводит к апоптозу.

Этиловый спирт, образующийся при брожении, в повышенных концентрациях уменьшает активность дрожжей, а также присутствие спирта снижает и останавливает усвоение азотистых веществ [132]. Это одна из причин постепенного прекращения брожения при определенном значении содержания спирта. Концентрация спирта, которая может блокировать ферментацию, зависит, в частности, от типа дрожжей. Влияние этанола на различные функции дрожжей было хорошо изучено. Добавление спирта в питательную среду приводит к удлинению латентной фазы, которая напрямую зависит от количества присутствующего спирта; экспоненциальная фаза роста удлиняется, а общий рост уменьшается.

H_2O_2 , как представитель РОС, вызывает окислительный стресс:

- Повреждения:

- Окисление липидов мембран, белков (карбонилирование) и ДНК (разрывы цепей).

- Нарушение редокс-баланса клетки.

- Защитные системы:

- Ферменты каталаза (CAT1) и супероксиддисмутаза (SOD1), нейтрализующие ROS.

- Активация транскрипционных факторов (Yap1p).

- Дозозависимость:

Низкие концентрации (1–5 мМ) могут стимулировать антиоксидантные пути, тогда как >10 мМ приводят к массовой гибели [133].

В Германии в конце 20-го века были доказаны канцерогенные свойства ароматических аминов. Всего имеется три основных ароматических амина, ведущих к образованию рака мочевого пузыря у человека: 2-нафтиламин, бензидин и 4-аминобифенил. В организме активация ароматических аминов происходит начиная с их ацетилирования до ароматических амидов. Далее идет микросомальное N-окисление ароматических аминов до N-гидроксиариламинов, которые способны вступать в прямую реакцию с ДНК, и окисление ароматических амидов до арилгидроксиаминовых кислот. Конечными соединениями являются ацетилированные в случае амидов и неацетилированные в случае аминов производные ДНК, появляющиеся при ковалентном присоединении азота к С-8 дезоксигуанозина [134].

В научных источниках, посвященных влиянию канцерогенов на организм, описываются обширные исследования, иллюстрирующие частые случаи развития онкологии у экспериментальных животных, подверженных химико-биологическому влиянию широкого списка ароматических аминов.

Ароматические амины – это производные ароматических углеводов, в которых аминогруппы (NH₂) замещают собой один или несколько атомов водорода в бензольном кольце.

Эпидемиологические исследования показывают, что ароматические амины можно считать одним из основных факторов развития онкологии

мочевого пузыря. Очень часто среди сотрудников красильных производств бытует мнение, что основным способом влияния ароматических аминов на организм является табачный дым, что именно курение является главным фактором возникновения онкологии мочевого пузыря у людей, имеющих склонность к курению.

Такие ароматические амины, как 2-ацетамидофлуорен и 2-нафтиламин, не относятся к прямым канцерогенам, так как они получают сильные выраженные канцерогенные свойства в ходе метаболической активации. Активными прямыми канцерогенами, скорее всего, являются арилгидроксиламины, которые обладают химическими свойствами, которыми также обладают алкилирующие канцерогенные агенты. Большая часть соединений с канцерогенными свойствами вступают в реакцию либо сразу, либо вследствие некоторой метаболической активации с сульфгидрильными соединениями: взаимодействие с глутатионом, видимо, ведет к дезактивации канцерогенных свойств и представляет собой процесс дезактивации или детоксикации. Канцерогенные полициклические углеводороды тоже трансформируются во время окислительных процессов, что делает возможным присоединение к сульфгидрильным соединениям и белкам.

Вероятность появления онкологии мочевого пузыря у людей, злоупотребляющих табаком, варьируется в большей части случаев от 1,5 до 3,0 раз выше, чем у людей со здоровым образом жизни, но встречаются и значительно превосходящие показатели. Так появилась гипотеза, что именно присутствие ароматических аминов в табаке делает его источником возникновения онкологии мочевого пузыря [135].

На данный момент науке известны три ароматических амина, которые с наибольшей долей вероятности ведут к развитию онкологии мочевого пузыря: 2-нафтиламин, бензидин и 4-аминобифенил.

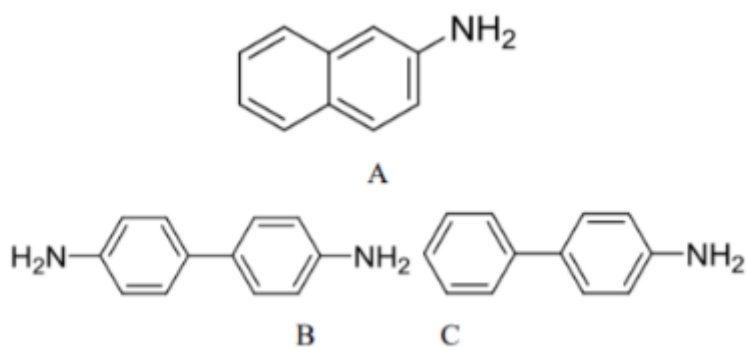


Рисунок 1.4.2 – Строение первичных ароматических аминов (А – 2-нафтиламин, В – бензидин, С – 4-аминобифенил)

Принято считать, что канцерогенное действие ароматических аминов на мочевой пузырь вызвано ионом нитрена, являющимся конечной электрофильной формой этих самых аминов. Ион нитрена доставляется в устойчивой форме в мочевой пузырь, где активизируется из-за изменения кислотности среды.

Класс первичных ароматических аминов (ПАА) обладает огромным промышленным значением, ведь используется в широком спектре производств. Наиболее широко первичные ароматические амины нашли свое применение в качестве промежуточных продуктов при производстве азокрасителей, продукции из резины, а также антиоксидантов для некоторых потребительских товаров. Несмотря на это ПАА являются пищевыми загрязнителями, и их можно встретить в упаковках некоторых продуктов питания [135].

Согласно научным исследованиям, ароматическим аминам свойственны токсикологические свойства, что вызывает особое внимание со стороны служб за экологическим надзором. ПАА вызывают серьезную обеспокоенность со стороны организаций, в чьи компетенции входит наблюдение за экологической обстановкой, особенно на фоне растущей статистике по заболеваемости раком среди сотрудников некоторых отраслей. Удаление известных канцерогенов из промышленного оборота слабо исправляет ситуацию, что особенно выделяет значимость этой проблемы (ПАА вызывают серьезную обеспокоенность у организаций, ответственных за мониторинг экологической обстановки, особенно в свете растущей заболеваемости раком среди работников отдельных отраслей

промышленности. Исключение известных канцерогенов из производственного процесса лишь незначительно улучшает ситуацию, что подчёркивает остроту и актуальность данной проблемы.) [135].

ПАА включают толуолдиамины (ТДА) и метилендианилины (МДА), такие как 2,4- TDA, 2,6-TDA, 4,4'-MDA, 2,4'-MDA и 2,2'-MDA. Все перечисленные ПАА обладают канцерогенным, генотоксическим и аллергенным действием [136].

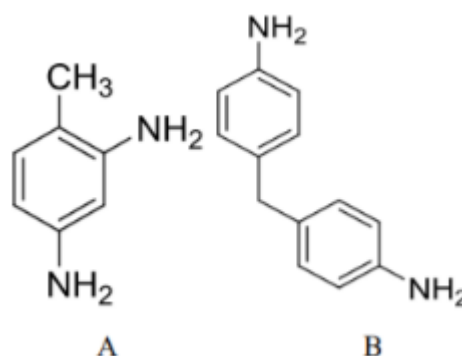


Рисунок 1.4.3 – Строение 2,4-Диаминотолуол (А), 4,4'-Метилендианилин (В)

Ухудшения экологической обстановки в современном мире все пагубней сказывается на здоровье людей. Проблема воздействия канцерогенов остается значимой, ведь с развитием современных наук стали возможны более подробное исследование и поиск решений этой проблемы. Выявление источников возникновения злокачественных опухолей и способов действия как генотоксических, так и негенотоксических канцерогенов, является частью экологической генетики, использующей как традиционные и хорошо известные, уже апробированные подходы, так и новые достижения и открытия в области фундаментальной биологической науки.

1.5 «Зелёный» и радиационно-химический синтез наночастиц серебра и селена

Методы синтеза наночастиц (НЧ) постоянно совершенствуются, появляются новые подходы, ориентированные на получение стабильных систем. Это особенно важно, поскольку наночастицы обладают высокой поверхностной энергией и склонны к агрегации, образуя более крупные структуры. Характеристики и свойства НЧ в значительной степени зависят от выбранного метода синтеза и условий его проведения.

В нанотехнологии широко используются концепции синтеза «сверху вниз» и «снизу вверх». Первый подход – это, как правило, физические методы, осуществляемые при высоких температурах и давлениях. Второй – основан на химических и физико-химических реакциях восстановления или окисления, в результате которых атомы или молекулы преобразуются в нейтральные частицы и объединяются в структуры различной размерности – от ангстремов (0,1 нм) до нанометров и выше. В итоге формируются полимолекулярные или коллоидные системы с различной степенью дисперсности [137].

При определённых методах «снизу вверх» и соблюдении соответствующих условий возможно получение наночастиц с близкой к монодисперсной структурой и высокой устойчивостью. На рисунках 1.5.1 и 1.5.2 представлены общий принцип синтеза наночастиц, а также классификация методов: физические, химические, физико-химические и биологические.

Используя термин «синтез» (обычно в химии понимают, как формирование «сложного» из «простого»), мы делаем это для объединения всех методов, понимая, что в случае физических методов по принципу «сверху вниз», мы имеем дело не с синтезом, а с производством НЧ путем «дробления» массивного материала до частиц наноразмерности.

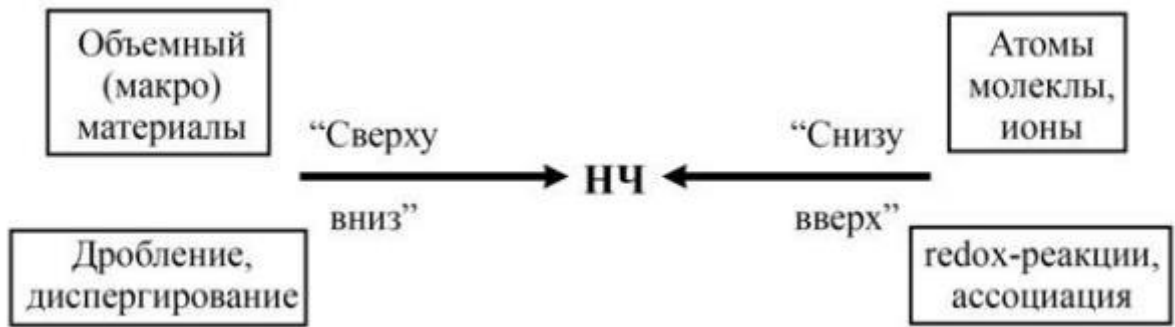


Рисунок 1.5.1 – Основной принцип синтеза НЧ.

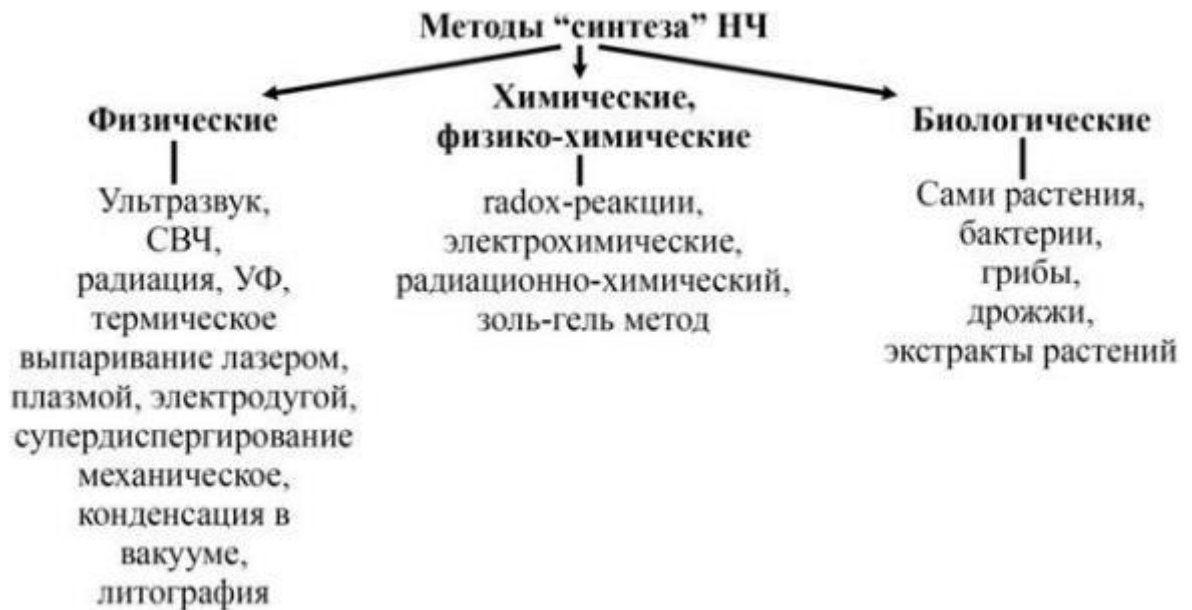


Рисунок 1.5.2 – Классификация методов синтеза НЧ

Среди различных видов НЧ (по геометрии, по химической природе, волокна, пленки, трубки и др.) важное место занимают наночастицы металлов (НЧМ), обладающие уникальными физическими и химико-физическими свойствами [136,137].

Каждый из приведенных методов «синтеза» НЧМ имеет свои недостатки и достоинства.

Не вдаваясь в детали, можно сказать, что физические методы требуют дорогой, специальной аппаратуры, классические химические и физико-

химические методы дополнительно к необходимости, как правило, сложной аппаратуры требуют использования токсичных реагентов.

Особняком стоят биологические «зеленые» методы синтеза НЧМ, которые отличаются простотой, экологичностью, управляемостью. На них мы и сфокусируемся по этим причинам и потому, что мы ими занимаемся предметно.

Но прежде, чем перейти к «зеленому» синтезу НЧМ, необходимо кратко перечислить современные, аналитические методы оценки характеристик НЧ: их размеры, распределение по размерам (полидисперсность), геометрия частиц (морфология), физические свойства (оптические, электрические, магнитные, теплопроводность и др.).

Без таких методов развиваться нанотехнологии не могут (не измерить, не пощупать – значит не понять). Поэтому появление электронной микроскопии высокого разрешения (зондовая, просвечивающая, атомно-силовая, сканирующая) послужило катализатором развития нанонауки и нанотехнологии [137].

«Зеленый» синтез – метод получения наночастиц различной морфологии из солей соответствующих металлов с использованием в качестве восстанавливающих с использованием биологических источников, таких как растения, грибы, бактерии или водоросли. Метод позволяет получать металлические наночастицы размером от 1 до 100 нм сферической, трехгранной, пентагональной и гексагональной форм. Малые размеры частиц позволяют легко преодолевать различные биологические барьеры (капиллярные стенки, плацентарный, гематоэнцефалический барьеры) [138].

Согласно исследованиям, экстракты растений содержат ряд метаболитов и восстановительных биомолекул, отвечающих за восстановление ионов металлов. В их число входят такие вещества, как флавоноиды, кетоны, альдегиды, амиды, алколоиды, фенольные кислоты, карбоновые кислоты, углеводы, белки, витамины и полисахариды. Что обуславливает возможность использования экстрактов растений в качестве стабилизатора и восстановителя во время синтеза наночастиц. На форму и размер частиц влияют такие факторы,

как концентрация и соотношение экстрактов растения и солей, рН раствора и температура синтеза. Оптимизация условий реакции позволяет достичь более эффективного восстановления, что может привести к получению наночастиц с желаемыми свойствами. Так повышение температуры способствует увеличению скорости реакции и эффективности синтеза наночастиц. Также что при кислых значениях рН начинает преобладать процесс агрегации над процессом восстановления наночастиц, что негативно сказывается на зеленом синтезе [138].

Механизм синтеза металлических наночастиц в растениях и растительных экстрактах включает три основные фазы:

1) Фаза активации является первой и наиболее важной фазой в механизме синтеза металлических наночастиц. В данной фазе происходит восстановление ионов металла и нуклеация восстановленных атомов металла, что является начальным шагом формирования наночастиц. В процессе синтеза биоактивные компоненты растительного экстракта играют роль восстановителей. Они передают электроны ионам металла, что приводит к их восстановлению из ионного состояния в металлическую форму. Восстановление происходит путем переноса электронов с активных групп биоактивных соединений в ионы металла, что снижает их окислительное состояние. После восстановления ионов металла происходит нуклеация - образование первичных наночастиц.

2) После фазы активации начинается рост наночастиц. В процессе роста наночастиц, восстановленные атомы металла, агрегируются, что приводит к образованию более крупных структур. Это происходит за счет диффузии свободных атомов металла из окружающего раствора к уже образовавшимся атомам. Фаза роста является важным этапом в синтезе наночастиц, поскольку определяет конечные размеры и формы частиц.

3) В фазе стабилизации, образовавшиеся наночастицы покрываются биологическими молекулами, присутствующими в растительном экстракте, что помогает предотвратить агрегацию частиц и обеспечивает стабильность наночастиц. В этой фазе наночастицы достигают своей окончательной формы и размера, а также стабилизируются, что сохраняет их структуру и предотвращает

их агрегацию. Стабилизация частиц обеспечивается несколькими механизмами. Один из них – это биомолекулярное покрытие, где органические молекулы, такие как белки, полисахариды или флавоноиды, связываются с поверхностью наночастиц и формируют защитный слой. Данный эффект основан на принципе отталкивания частиц благодаря пространственным “препятствиям”. При наличии поверхностно-активного вещества или полимера на поверхности наночастицы, его молекулы формируют слой, который занимает дополнительное пространство и предотвращает сближение других наночастиц. Другой механизм стабилизации – это электростатическое отталкивание. В этом случае поверхность наночастиц заряжается положительно или отрицательно, и одноименные частицы отталкиваются друг от друга. Это предотвращает агрегацию и обеспечивает стабильность наночастиц [139].

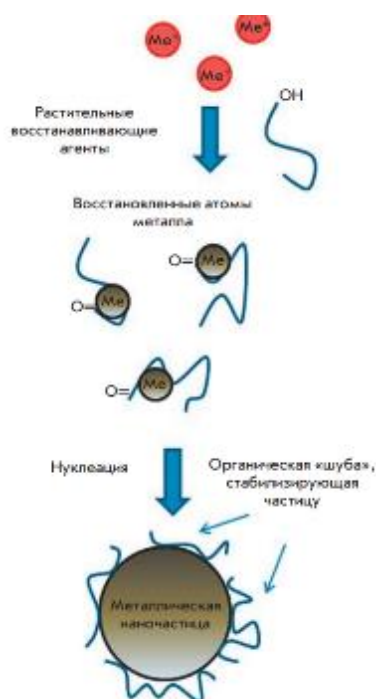


Рисунок 1.5.3 – Схема зеленого синтеза наночастиц

Также исследования Chihiro Mochizuki показали, что наночастицы золота в воде увеличивают при радиолитическом облучении количество активных форм кислорода. Так при облучении выход гидроксильного радикала (OH^\bullet) и супероксиданион-радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$) увеличился в 1,46 и 7,68 раза. Процент гибели опухолевых клеток (4T1) при облучении рентгеновскими лучами в дозе 8 Гр составил 12%, в то

время как обработка их наночастицами золота увеличила процент гибели до 24% [138].

S. M. A. A. Mousavi и др. для получения наночастиц серебра использовали лизат бактерий *Lactobacillus rhamnosus*, которой был смешан с раствором нитрата серебра в концентрации 1 мМ. Наночастицы имели сферическую форму и средний размер 50 нм. Авторы показали, что синтезированные наночастицы серебра могут индуцировать активные формы кислорода внутри линии клеток колоректального рака (HT-29) и вызывать повреждение клеточных компонентов, что приводит к гибели клеток. Это исследование показало потенциальный подход к синтезу противоопухолевых наночастиц серебра [140].

Также был проведен зелёный синтез с растением клейстокаликс покрытый (*Cleistocalyx operculatus*) и селенистой кислотой 3 мМ. Полученные наночастицы селена показали антимикробную активность в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка. Определение параметра острой токсичности наночастиц селена по Керберу для белых мышей показало, что полулетальная доза (ЛД50) для мышей равна 7,75 мг/кг. Мыши показали нормальное потребление пищи и активность в течение времени тестирования, что указывает на то, что наночастицы селена безопасны для человека и животных [141].

Наночастицы меди, синтезированные из экстракта листьев древогубца метельчатого, показали противогрибковые свойства. Полученные наночастицы имели сферическую форму и средний диаметр 5 нм. Результаты исследования показали, что растительный экстракт без наночастиц меди не оказывает противогрибковых свойств против грибов *Fusarium oxysporum*. Но при добавлении в экстракт сульфат меди, и образовании наночастиц, эффективность в ингибировании роста мицелия возрастает. Так содержание 0,24 % наночастиц меди вызывает гибель 76% патогенных грибов. Таким образом, результаты исследования указывают на потенциальное использование синтезированных наночастиц меди в качестве противогрибкового средства [142].

Кроме того, описан синтез наночастиц селена с использованием водного экстракта ягод тропического растения (*Murraya koenigii*). Полученные частицы

размером от 50 до 150 нм имели сферическую форму и проявляли антибактериальную активность против грамположительных (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*) и грамотрицательных (*Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерий при концентрации 40 и 50 мкг/мл. Также исследования показали высокие антиоксидантные свойства наночастиц селена и низкую цитотоксичность в отношении макрофагов мыши (RAW 264.7) и рачков артемия салина (*Artemia salina*) [143].

Способы получения наночастиц используя «Зелёный синтез»: известно множество различных химических и физических методов получения наночастиц серебра, среди которых особое место занимают методы «зеленого» синтеза, когда в качестве восстанавливающих соли металлов и стабилизирующих образующиеся наночастицы реагентов используются различные продукты метаболизма растений. Такой подход отличается от «стандартных» методов синтеза наночастиц металлов простотой, дешевизной, легкой масштабируемостью и «экологичностью», т. е. безопасностью для окружающей среды и совместимостью с живыми тканями, что позволяет, в принципе, использовать полученные наночастицы благородных металлов для медицинских целей. Недостатком метода «зеленого» синтеза является трудность интерпретации протекающих при этом процессов, связанная с большим разнообразием участвующих биохимических реагентов, а также проблемы, связанные с очисткой получаемых наночастиц металлов.

Существуют исследования, в которых используются трехвалентные ионы редкоземельных элементов Dy^{3+} , Tm^{3+} и Eu^{3+} , образующихся при «зеленом» синтезе с использованием водных экстрактов мяты перечной. Наличие указанных ионов приводит к изменению характеристик получаемых коллоидов, а также к возникновению у наночастиц оболочек, содержащих редкоземельные ионы [144].

В иных исследованиях L-AgNP биосинтезировали из водного экстракта листьев *L. Lalambenesis* и оценивали способность биологически активных

компонентов экстракта выступать в роли биокатализаторов восстановления ионов серебра до серебра [145].

Радиационно-химический синтез наночастиц металлов в растворах проводится с использованием источников γ -излучения (например, ^{60}Co). Эффект облучения зависит от различных факторов – мощности источника, времени облучения, состава и pH раствора, концентраций реагентов, температуры и др., причем четыре последних фактора могут изменяться за время облучения. Радиационный выход (число образовавшихся активных частиц на 100 эВ поглощенной энергии) зависит от дозы облучения; последняя определяется как произведение мощности дозы (обычно Гр/с) на время облучения. Начальный выход первичных реакционноспособных частиц (ионов, электронов, возбужденных частиц) составляет величину порядка нескольких единиц (обычно не более 10), в зависимости от состава среды (главным образом, от природы растворителя). Восстановление ионов металлов проводится обычно в водно-спиртовых растворах. Образующиеся при восстановлении атомы и малые кластеры металла являются зародышами наночастиц. Радиационно-химический синтез всегда проводится в бескислородной среде – под вакуумом или в атмосфере инертного газа. В отличие от фотохимического синтеза, здесь пространственное распределение первичных промежуточных продуктов происходит более равномерно и поэтому возможен синтез частиц с более узким распределением по размерам. Однако и при радиационно-химическом синтезе получение стабильных наночастиц невозможно без стабилизирующих добавок.

Важным преимуществом радиационно-химического восстановления ионов металлов можно назвать возможность получения наночастиц металлов однородных по форме и размерам, а также лишенных примесей химических восстановителей и побочных продуктов [146].

1.6 Влияние ионов серебра и селена на выживаемость дрожжей рода *Saccharomyces*

Огромный потенциал нанотехнологий в различных отраслях произвел революцию в биологии и медицине. В последние годы нанотехнологии привлекают интенсивные исследования и разработки на академическом и промышленном уровнях благодаря их широкому применению в сельском хозяйстве [147]. Нанотехнологии считаются неотъемлемой частью обработки пищевых продуктов и производства традиционной пищи, так как многие продукты питания содержат наноразмерные компоненты. Однако способность наночастиц вызывать хронические эффекты для здоровья и экотоксичность остается серьезной проблемой для исследователей [148].

Экономические перспективы и возможности, создаваемые нанотехнологиями, крайне значимы для человечества, так как они оказывают существенное влияние на качество жизни и создание благосостояния. Будущие направления нанотехнологических продуктов в некоторых секторах включают биосовместимые материалы, наносенсоры, наномедицину, нанофотонику, наноматериалы с новыми функциональными свойствами, нанофлюидику, доставку лекарств с использованием наноплатформ, пластиковую электронику, нанокатализ, нанооптику и водородные технологии [149]. Еще одним интересным применением нанонауки являются современные системы пожарной безопасности. Нанонаука и нанотехнологии рассматриваются как будущее в области противопожарной защиты [150]. Наночастицы стали альтернативой традиционным упаковочным материалам. Их использование положительно влияет на качество, безопасность, защиту и срок годности продуктов питания [151]. Широкое применение нанонауки, такое как концепция наномедицины, основано на прогрессе в исследованиях наноматериалов и наноинженерии. Уникальные физико-химические свойства наночастиц позволяют эффективно использовать их для диагностики и лечения заболеваний на молекулярном

уровне. Нанотехнологии в медицине объединяют мультидисциплинарные области для достижения лучших результатов. Например, одним из перспективных направлений является лечение и профилактика заболеваний внутри организма. Нанонаука революционизировала медицинские и научные области, включая профилактику, диагностику, терапию, таргетированную доставку лекарств к клеткам, контроль развития заболеваний, защиту и восстановление тканей, а также улучшение биологических систем человека и обезболивание [152]. Квантовый эффект наноматериалов становится значимым при уменьшении их размера до 100 нм и менее. Высокое отношение поверхности к объёму обеспечивает более эффективное взаимодействие наноматериалов с окружающими структурами [153]. Суть нанотехнологий и нанонауки заключается в свойствах материалов, которые кардинально отличаются от свойств массивных материалов. Известно, что при уменьшении размеров материала ниже 100 нм происходят значительные изменения его характеристик. Наночастицы также демонстрируют повышенную эффективность в условиях *in vitro* и *in vivo* по сравнению с массивными материалами при аналогичном применении [154, 155].

Данные нанокompозиты используются в качестве покрывного материала, выделяющего соединения меди в питательной среде для дрожжей и плесени, предпочтительно для *S. cerevisiae* [156]. Технологический прогресс в исследованиях наночастиц выявил особый интерес к наночастицам серебра (AgNPs) как к антимикробным агентам [157]. Уже давно известно, что серебро и его соединения обладают сильным ингибирующим и бактерицидным действием на широкий спектр микроорганизмов, включая бактерии, грибы и вирусы [158]. Серебро демонстрирует высокую токсичность по отношению к микробам, но низкую – к клеткам млекопитающих [159]. Комплексы серебра также применялись в качестве сплавов в стоматологии [160]. AgNPs считаются важным противомикробным агентом [161], используемым для заживления ран, ожогов и лечения инфекций [162].

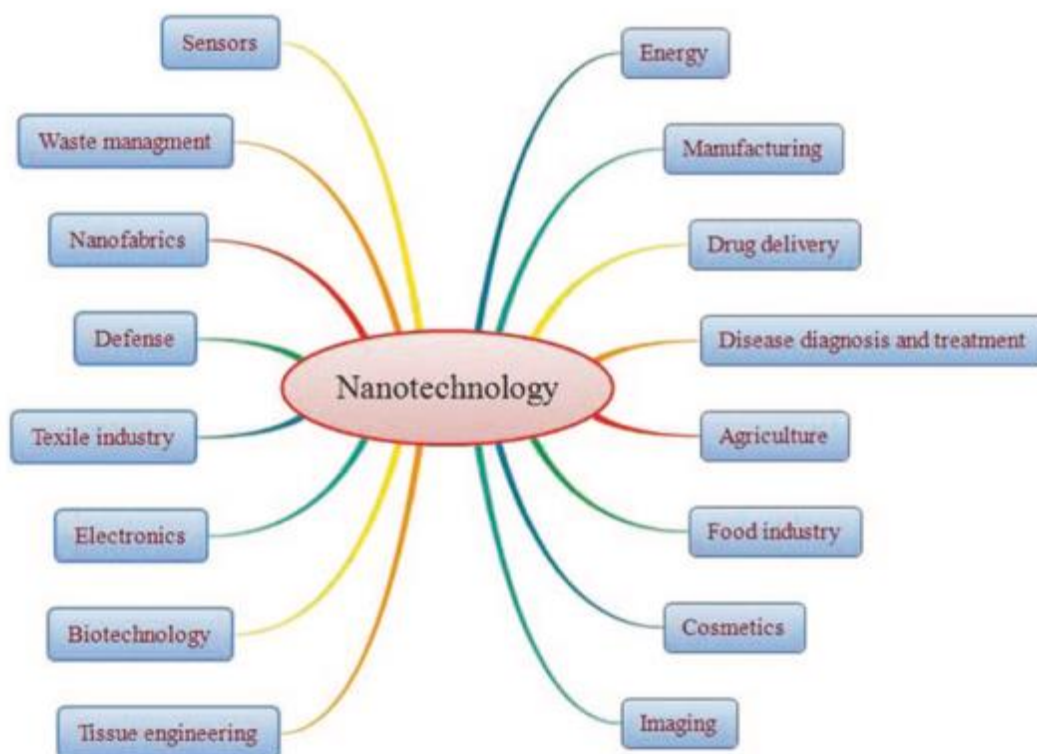


Рисунок 1.6.1 – Разработка и применение наночастиц в различных отраслях промышленности [162]

Наночастицы серебра действуют как дезинфицирующее средство против различных микробов, встраиваясь в серосодержащие белки клеточной мембраны микроорганизмов [163, 164]. Исследование подтверждает, что взаимодействие AgNPs с бактериальными клетками зависит от их размера и формы, что изменяет структуру и свойства клеток [165]. Для изучения взаимодействия AgNPs *in situ* применяется метод гибридизации FISH, который активно выявляет хромосомные аномалии, а также RT-PCR для анализа изменений экспрессии генов и отслеживания движения наночастиц. Сигналы, возникающие после Ca^{2+} -транзиентов в клетках, обработанных наночастицами, регистрируются для построения модели, объясняющей механизм токсичности AgNPs.

Наночастицы селена (Se NPs) привлекают все больше внимания в области медицины благодаря своим антиоксидантным, противовоспалительным, антимикробным и противораковым свойствам, а также рассматриваются как новое поколение лекарственных средств [166]. С другой стороны, проведены

многочисленные исследования по синтезу SeNPs с использованием различных штаммов пробиотических бактерий, таких как *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus acidophilus*, для обогащения пищевых продуктов, включая йогурт, сыр и молоко [167, 168]. Микроорганизмы, как экологически безопасные нанофабрики, используются для внутриклеточного и внеклеточного синтеза различных металлических наночастиц. Этот биосинтез инициируется метаболитами, присутствующими в микроорганизмах, такими как белки, углеводы, карбонильные группы, терпеноиды, алкалоиды, амины, амиды и фенольные соединения [169, 170]. Благодаря простоте контроля массового производства дрожжей и их быстрому росту на питательных средах, биосинтез металлических наночастиц с использованием дрожжей предпочтительнее по сравнению с бактериальными штаммами [168].

Мембранные оксидоредуктазы и хиноны, присутствующие в дрожжах, играют ключевую роль в синтезе металлических наночастиц. При повышении pH внутриклеточной среды дрожжей активируются редуктазы, которые восстанавливают ионы металлов с одновременным формированием наночастиц. Хиноны также обладают сильными нуклеофильными и редокс-свойствами, что делает их эффективными в восстановлении ионов металлов и их преобразовании в наночастицы [171].

Селен, как важный микроэлемент, играет ключевую роль в биосинтезе значимых селенсодержащих ферментов, таких как глутатионпероксидаза и тиоредоксинредуктаза, которые необходимы для здоровья человека, других млекопитающих и растений [172, 173]. Обогащенные селеном дрожжи, например *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. boulardii*, широко используются при производстве хлеба, пробиотических продуктов и алкогольных напитков [174 - 177]. Однако нет данных, подтверждающих использование дрожжами биосинтетических SeNPs в их метаболизме.

ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1 Исходные реактивы и их квалификация

В работе использовались следующие реактивы: дистиллированная вода, деионизированная вода на фильтрах Millipore, этиловый спирт для медицинских целей, 96%, хлороформ марки “хч”, пероксид водорода, ацетонитрил производства J.Becker марки “о.х.ч”, ортофосфорная кислота марки “х.ч”.ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидрозил), нитросиний тетразолий хлорид фирмы ACROS ORGANICS. 2,4-ДНФГ (2,4-динитрофенилгидразин), нитрат серебра AgNO₃ фирмы, селенит натрия Na₂SeO₃ фирмы РусХим, ионол (бутилгидрокситолуол) фирмы Sigma Aldrich, рутин, диамин нафталин, нафталин марки “х.ч.”

В качестве образцов для исследования применяли синтетические кумарин, дигидрокумарин, эскулин, эскулетин (6,7-дигидроксикумарин), скополетин, умбеллиферон, кофейная кислота фирмы SIGMA ALDRICH.

В качестве исследуемых растительных образцов использовались сухие препараты из аптечной сети, в том числе: трава донника лекарственного (*Melilotus officinalis*), побеги багульника болотного (*Ledum palustre*), лабазник, каркаде, а также листья муррайи метельчатой (*Murraya paniculata*), привезённые автором из Мьянмы.

В качестве тест-микроорганизмов выбраны дрожжи *S. cerevisiae* штамма Т-985 расы Мауен и дрожжи *S. carlsbergensis*. В ходе всех процессов культивирования использовались питательные среды следующего состава, г/л: (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄·7H₂O, дрожжевой экстракт, сахара, водопроводная вода, рН 5,8. Общий объем среды в одной колбе 50 мл.

2.1.1 Приготовление экстрактов донника, багульника, муррайи, лабазника и каркаде

Приготовление растительных экстрактов проводилось следующим образом: 1 г (точная навеска) измельченных листьев с помощью ротационного делителя необходимого растения вносят в колбу и заливают 100 мл деионизированной воды комнатной температуры. Затем по принципу водяной бани колбу ставят в емкость и заполняют водой ($t \approx 90^\circ\text{C}$) таким образом, чтобы уровень воды в емкости был равен уровню воды в колбе. Ждут остывания воды до комнатной температуры, сливают ее и повторяют процедуру еще 2 раза. Полученный экстракт фильтруют с помощью складчатого фильтра и используют для дальнейшего эксперимента. Раствор отфильтрованного экстракта багульника болотного, муррайи, лабазника и каркаде не подлежат длительному хранению.

Таблица 2.1.1– Параметры ротационного разделителя

Коэффициент разделения:	1:8, 1:10, 1:30
Число частей пробы:	8, 10 или 30
Макс. начальная крупность:	2,5 мм или 10 мм
Макс. количество пробы:	4.000 мл - 2.500 мл - 300 мл
Полезный объём приёмных стаканов:	500, 250, 30, 25, 20, 15 мл

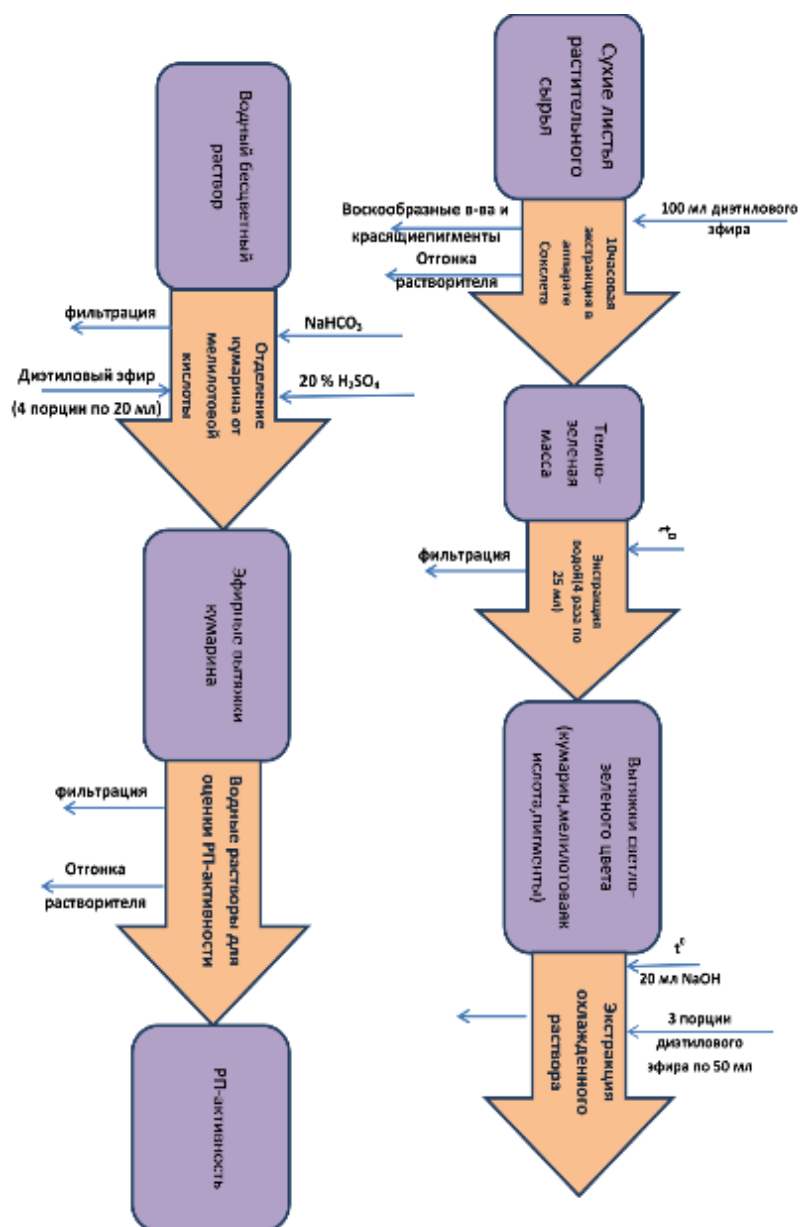
2.1.2 Приготовление кумаринов

Растворы кумаринов были приготовлены в водно-этанольной системе с концентрацией 1 мМ и 10 мМ.

2.2 Применяемые методики анализа¹

2.2.1 Методика выделения кумарина из донника и багульника

По методике [178] получены водные растворы кумаринов из донника лекарственного и багульника болотного (блок-схема 2.1).



Блок-схема 2.1 – Процесс выделения кумаринов из лекарственного сырья

¹ Все описанные методики применялись при работе над кандидатской диссертацией Пхйю Мьинт У. Реакционная способность донника, багульника, муррайи и некоторых кумаринов в их составе: дис. канд. хим. наук / Пхйю Мьинт У // М. : РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2018. – 145 с. [4].

Данный раствор использовали для дальнейшего исследования по определению радиопротекторной активности с использованием установки РХМ- γ -20 (пункт 2.13.1).

2.2.2 Методика определения кумарина в доннике хроматографическим методом

В траве донника лекарственного из аптечной сети (*Melilotus officinalis*) концентрация кумарина определена с использованием газожидкостной хроматографии [179-181]. Для этого в круглодонной колбе смешаны 25 мл полученного экстракта (пункт 2.2.1), 200 мл деионизированной воды и 25 мл хлороформа марки “х.ч.”, после перемешивания было добавлено 0,3 грамма Na_2SO_4 безводного и оставлено на 24 часа. Через сутки 10 мл отобранного нижнего слоя вакуумировали с помощью водоструйного насоса, высушенный остаток обработали 500 мкл нафталина в CHCl_3 (внутренний стандарт) и хорошо перемешали. 250 мкл данного раствора использован для исследования на ГЖХ [180]. После снятия хроматограммы получено отношение площадей пиков кумарина к нафталину и по калибровочной прямой зависимости внутреннего стандарта (нафталина) от концентрации кумарина количественно определено содержание кумарина в исходном экстракте. Данная методика была применена ко всем остальным водно-этанольным растворам донника.

2.2.3. Методика определения антирадикальных свойств экстрактов растений и кумаринов по их реакционной способности взаимодействовать со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом

Перед проведением экспериментов был приготовлен 0,2 мМ раствор 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила ДФПГ (МДФПГ = 394,33 г/моль) в этаноле [182].

Для построения калибровочной кривой использованы свежеприготовленные водно-спиртовые растворы лекарственных веществ с содержанием 1 мг/1 мл в 50% этаноле.

В контрольные пробирки вместо добавок внесены 2 мл 50% раствора этанола. Реакция запускается добавлением раствораДФПГ. Растворы приготовлены с разной концентрацией веществ в реакционной смеси (таблица 2.2.2). В контрольном опыте вместо экстракта в реакционную систему введен чистый этанол.

Таблица 2.2.1 – Методика [182] приготовления образцов сДФПГ в зависимости от добавки экстракта в систему с равным содержанием водно-этанольной части

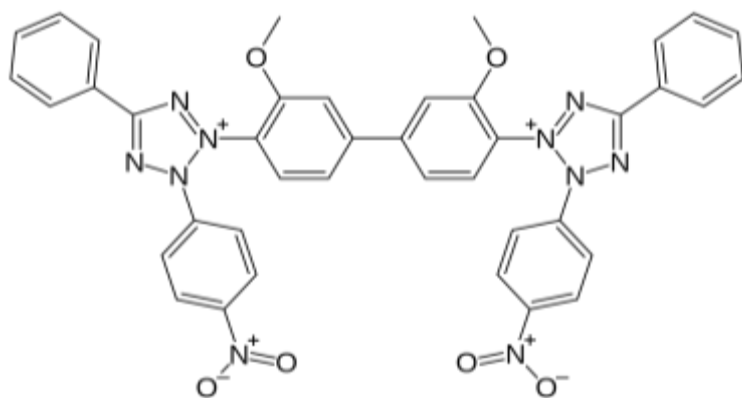
Объём добавок, мл	Объём 50% этанола, мкл	Объём 80% этанола для приготовления 2 мл р-ра, мкл	ОбъёмДФПГ, мл
10	40	1960	2
25	100	1900	
50	200	1800	
75	300	1700	
100	400	1600	
125	500	1500	

Содержимое пробирок было хорошо перемешано и помещено в темное место при комнатной температуре. Измерения проводили в течение 30 минут с интервалом 5 минут при длине волны 517 нм, чтобы проследить динамику связывания радикаловДФПГ растворами экстрактов кумаринсодержащих лекарственных растений и синтетических кумаринов (таблица 2.2.2).

Таблица 2.2.2 – Методика приготовления образцов с ДФПГ при одинаковой добавке экстракта в систему с разным содержанием водно-этанольной части

Водно-спиртовой раствор б.б, %	Объём экстракта, мкл	Объём воды, мкл	Объём 100% этанола для приготовления 2 мл р-ра, мкл	Объём 0,2ММ раствора ДФПГ, мкл
0	200	0	1800	2000
10		20	1780	
20		40	1760	
30		60	1740	
40		80	1720	
50		100	1700	
60		120	1680	
70		140	1660	
80		160	1640	
90		180	1620	
100		200	1600	

2.2.4 Методика определения реакционной способности кумаринов по отношению к супероксид-анион радикалу



Слева представлена линейная формула нитросинего тетразолия хлорида или NBT (nitro blue tetrazolium) $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$. Молекулярная масса 817,65 г/моль.

Растворы приготовлены с разной концентрацией веществ в реакционной смеси в соответствии с данными в таблице 2.2.3 и таблице 2.2.4. В контрольную пробу добавка кумаринов не вносилась. Данные исследования проводились в условиях аэрации.

Таблица 2.2.3 – Приготовление растворов для определения реакционной способности эскулина (Esc-Gl) в реакции с СОАР

№	[Esc-Gl], моль/л	V (Esc-Gl), мл	V (NBT), мл	V(EtOH), мл
1	1×10^{-3}	2	2	0
2	8×10^{-4}	1,6	2	0,4
3	6×10^{-4}	1,2	2	0,8
4	4×10^{-4}	0,8	2	1,2
5	1×10^{-4}	0,2	2	1,8

Таблица 2.2.4 – Приготовление растворов для определения реакционной способности эскулетина (Esc) в реакции с СОАР

№	[Esc], моль/л	V (Esc), мл	V (NBT), мл	V(EtOH), мл
1	1×10^{-3}	2	2	0
2	8×10^{-4}	1,6	2	0,4
3	6×10^{-4}	1,2	2	0,8
4	4×10^{-4}	0,8	2	1,2
5	1×10^{-4}	0,2	2	1,8

Приготовление фосфатного буферного раствора с рН=7,4

В колбу на 400 мл помещают навеску 0,62 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 4,3 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и доводят деионизованной водой до метки.

2.2.5 Методика проведения реакции образования гидразона ацетальдегида

2,0 мл аналита смешивали с 0,4 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразона (2,4-ДНФГ) и ортофосфорной кислоты (1:7), смесь перемешивают и через 20 минут анализируют с помощью ВЭЖХ. Перед хроматографированием пробу фильтруют через фильтр типа “юла”. Для количественного определения проводят параллельно два опыта [183]. Для работы необходимо предварительная подготовка растворителей и реактивов, об этом будет рассмотрено в следующей части методической части диссертационной работы. Сведения из патентной работы [183].

Реакция образования гидразона [183]

2,4-динитрофенилгидразин, использующийся для градуировки прибора и для последующего проведения анализов, должен иметь одну и ту же степень очистки от гидразонов. Качество раствора 2,4-динитрофенилгидразина проверяют периодически путем проведения “холостого” опыта, в котором вместо анализируемого объекта берут тот же объем смеси ацетонитрил-вода (1:1). Площади пиков “холостого” опыта при периодической проверке и при градуировке должны различаться между собой и не более чем на 10%.

Подготовка растворителей и реактивов в исследовании образования гидразона ацетальдегида [183].

Очистка этилового спирта от альдегидов и кетонов. К 200 см³ 98%-го этилового спирта добавляют 0,4 г 2,4-динитрофенилгидразина, 100 мм³ концентрированной хлористоводородной кислоты и кипятят с шариковым холодильником на водяной бане в течение 1ч. Перегоняют с дефлегматором в приборе со стеклянными шлифами, отбрасывая первые и последние 20 см³, после этого перегоняют повторно. Хранят в холодильнике, вдали от растворов альдегидов. Очистку 2,4-динитрофенилгидразона [183] от примесей проводят методом перекристаллизации из раствора в очищенном этиловом спирте. Для этого 2,4-динитрофенилгидразон растворяют в нагретом примерно до 60°C

этиловом спирте до получения насыщенного раствора, раствор фильтруют через фильтр из пористого стекла. Осаждение 2,4-динитрофенилгидразина из насыщенного раствора ведут быстро при перемешивании, постепенно охлаждая его до комнатной температуры в емкости с водой, наполненной льдом. Процедура осаждения должна длиться не более 1,5 часов. Осадок, выпавший после охлаждения спиртового раствора, должен быть мелкокристаллическим. Его отделяют центрифугированием, промывают несколькими порциями охлажденного до 4-10°C этилового спирта и высушивают в вакуумном эксикаторе до постоянного веса. Контроль чистоты проводят хроматографическим методом. На хроматограмме должны отсутствовать пики, соответствующие пикам ДНФ – производных ацетальдегида и формальдегида. В случае наличия этих пиков проводят повторную перекристаллизацию 2,4-ДНФГ. Перекристаллизованный 2,4-ДНФГ хранят в эксикаторе.

Приготовление раствора 2,4-динитрофенил гидразина в ацетонитриле 1 мг/мл [183].

В стеклянную пробирку с прошлифованной пробкой берут навеску 1,5 мг перекристаллизованного 2,4-динитрофенилгидразина и растворяют в таком объеме ацетонитрила, чтобы концентрация 2,4-денитрофенилгидразина составила 1 мг/мл. Хранят в холодильнике, вдали от растворов альдегидов.

Приготовление раствора ортофосфорной кислоты (1:7) [183].

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 30–40 мл дистиллированной воды, осторожно приливают мерным цилиндром 12,5 мл ортофосфорной кислоты (85%), перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой.

2.3 Получение культур дрожжей, устойчивых к воздействию высоких концентраций пероксида водорода

В начале эксперимента образцы дрожжей были помещены в колбы объёмом 100 мл, содержащие питательную среду. Колбы были размещены на качалке в термостатированном инкубаторе при температуре 30 °С.

Через 18 часов после начала культивирования в клеточную суспензию был добавлен пероксид водорода с концентрацией 0,6 г/л. После чего, колбы снова ставили на качалку на 12 часов, а затем содержимое пересевали на свежую питательную среду.

Вся процедура повторялась с небольшим увеличением концентрации пероксида водорода на каждом последующем цикле культивирования. Концентрация пероксида водорода увеличивалась на 50–100% относительно предыдущей концентрации, что обеспечивало выживание клеток после пересева. Максимальная концентрация пероксида водорода составила 6 г/л.

После достижения устойчивого роста культуры объём колб был уменьшен до 50 мл, при этом концентрация пероксида водорода оставалась неизменной. В случае гибели культуры после добавления пероксида водорода обработке подвергался резервный образец, в который добавлялась сниженная концентрация пероксида водорода.

В результате эксперимента были получены устойчивые к пероксиду водорода культуры дрожжей *S. cerevisiae* адаптированные к концентрации 0,6 г/л – **Cere1** и адаптированные к концентрации 6 г/л – **Cere2**.

2.3.1 Проверка устойчивости дрожжей с помощью культивирования на чашках Петри с внесенным в среду пероксидом водорода

Для проведения экспериментов были приготовлены три варианта агаризованной питательной среды с добавлением пероксида водорода в различных концентрациях: 10 мкл, 30 мкл и 60 мкл. Пероксид водорода был добавлен после охлаждения среды до температуры 30–35 °С для предотвращения его термического разложения.

В полученную агаризованную среду было внесено 0,1 мл суспензии дрожжей, предварительно разведённой в 10 раз. Суспензия была равномерно

распределена по поверхности агаризованной среды с использованием стерильного шпателя.

Засеянные чашки были помещены в термостат, где поддерживалась постоянная температура 38 °С. Устойчивость дрожжей к окислительному стрессу оценивалась на основании количества образовавшихся колоний на третий день после инокуляции.

2.4 Культивирование дрожжей *S. cerevisiae* в присутствии и отсутствии различных добавок

В данной работе были задействованы такие вещества как пероксид водорода, нафталин, 2,3-диаминонафталин, ионол, медицинский 96% этанол, а также дрожжи *S. cerevisiae* штамма T-985 расы Mayen и дрожжи *S. carlsbergensis*. В работе использовались заранее приготовленные водные растворы нафталина и 2,3-диаминонафталина с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ М и 70% этанольный раствор с содержанием $5 \cdot 10^{-4}$ М ионола. В процессе пересева часть суспензии (5–10% по объему) отбирали из колбы, которые высевали на питательную среду с целью последующего использования в качестве контроля. В ходе пассивации и адаптации к пероксиду водорода каждый род дрожжей включал в себя 2 колбы с культурой. Колба 1 – контроль, без добавления каких-либо веществ. Колба 2 включала в себя культуру, которая культивировалась на протяжении 18–36 часов с добавлением в каждый пассаж исследуемого вещества или нескольких одновременно (H_2O_2 , нафталина, 2,3-диаминонафталина или ионола). После окончания культивирования из колб отобрали аликвоты дрожжевой суспензии и переносили их в стеклянные объемом 2 мл для последующего облучения.

2.5 Культивирование дрожжей *S. cerevisiae* с добавлением 40% и 70% этанола, инола с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 37% пероксида водорода

В работе были использованы следующие вещества: рутин с концентрациями $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 40% и 70% этанол, инол с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, 37% пероксид водорода, а также дрожжи *S. cerevisiae*. В процессе пересева часть суспензии (5–10% по объему) отбирали из колбы, которые высевали на питательную среду с целью последующего использования.

Культивирование дрожжей *S. cerevisiae* проводили в аэробных условиях при перемешивании в колбах на термостатируемой качалке при 28°C, 150 об/мин. Объем колб 200 мл, объем стерилизуемой среды в колбах 50 мл. Посевной материал зависел от условий выращивания эксперимента, а именно – от 2 до 10% об. Для получения одинакового рабочего материала все дрожжевые культуры выращивали при уровне освещения 750 лк на поверхности среды.

В ходе пассивации и адаптации к рутину каждый род дрожжей включал в себя 3 колбы с культурой. Колба 1 – контроль, без добавления каких-либо веществ. Колбы 2 и 3 включали в себя культуру, которая культивировалась на протяжении 18–36 часов с добавлением в каждый пассаж исследуемого вещества с разными концентрациями. После окончания культивирования из колб отобрали аликвоты дрожжевой взвеси и перенесли их в стеклянные объемом 1 мл для последующего облучения.

Для достижения адаптации клеток к добавляемым веществам необходимо повторять пересев не менее 5–7 раз, отслеживая биомассу по оптической плотности, прежде чем проводить эксперименты с облучением. Это обуславливает долгую подготовку и длительность проведения эксперимента.

2.6 Методика количественной оценки числа микроорганизмов методом Коха

Микрометод Коха используется для количественной оценки числа микроорганизмов на плотных питательных средах [113]. Он основан на классическом принципе Коха, согласно которому каждая отдельная колония на питательной среде возникает из одной микробной клетки. Это позволяет по числу сформировавшихся колоний, при посеве определённого объёма микробной суспензии, судить о начальной концентрации клеток в образце.

Результаты анализа выражаются в колониобразующих единицах (КОЕ), которые представляют собой условную единицу, соответствующую одной жизнеспособной клетке или группе клеток, давшей начало колонии.

Метод включает три основных этапа:

1. Приготовление последовательных разведений исследуемой суспензии.
2. Посев на плотную питательную среду в чашки Петри.
3. Подсчёт выросших колоний после инкубации.

Для работы использовано:

- Суспензия чистой культуры микроорганизмов
- Чашки Петри с агаризованной питательной средой (LB-агар)
- Пипеточные дозаторы с одноразовыми насадками
- Микропробирки (эппендорфы)
- Спиртовая горелка для стерильной работы

Готовились последовательные десятикратные разведения исходной микробной суспензии в стерильной водопроводной воде: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} . Для этого к 0,9 мл воды в стерильной пробирке добавляли 0,1 мл суспензии, тщательно перемешивали и переходили к следующему разведению.

Из каждого разведения на поверхность LB-агара в чашках Петри высевали по 0,003 или 0,005 мл суспензии. Посев начинался с наиболее разбавленного образца (10^{-7}) и выполнялся по схеме, представленной на рисунке 2.6.1.

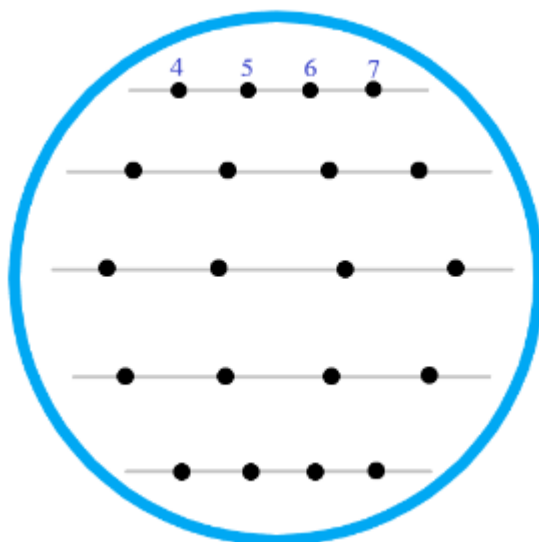


Рисунок 2.6.1 – Схема посева микрометодом Коха для количественного учёта микроорганизмов

Засеянные чашки Петри помещали в термостат и инкубировали в течение 24–48 часов. По завершении инкубации проводили подсчёт сформировавшихся колоний. Зная число колоний и использованную степень разведения, рассчитывали количество микроорганизмов в 1 мл исследуемой суспензии, пользуясь формулой [113]:

$$N = \frac{(\bar{a} \pm 2\sigma_{\bar{a}})K}{V}$$

N – количество микроорганизмов в 1 мл суспензии;

K – разведение, из которого произведён высев;

\bar{a} – среднее количество колоний на чашке Петри при разведении K ;

V – объём суспензии, взятый для посева, мл;

2 – критерий при 95%-ном уровне значимости;

$\sigma_{\bar{a}}$ – среднее квадратичное отклонение, равное $\pm \frac{\sqrt{\sum a}}{n}$;

n – число повторностей.

2.7 Сведения об использовании 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида при исследовании антиоксидантных свойств

Некоторые вещества - свободные радикалы, из-за тех или иных кинетических или стерических ограничений, являются достаточно стабильными при нормальных условиях. Дифенилпикрилгидрозил (сокращенно ДФПГ) – стабильный свободный радикал имеет свойство восстанавливаться, отдавая протон и изменять свою окраску в среде, в которой присутствуют антиоксиданты. Фиолетовая окраска переходит в желтую [53].

Скорость его восстановления и изменение на желтую окраску тем выше, чем выше антиоксидантная активность исследуемого раствора.

Спектрофотометрический метод основан на использовании свободного стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила (ДФПГ).

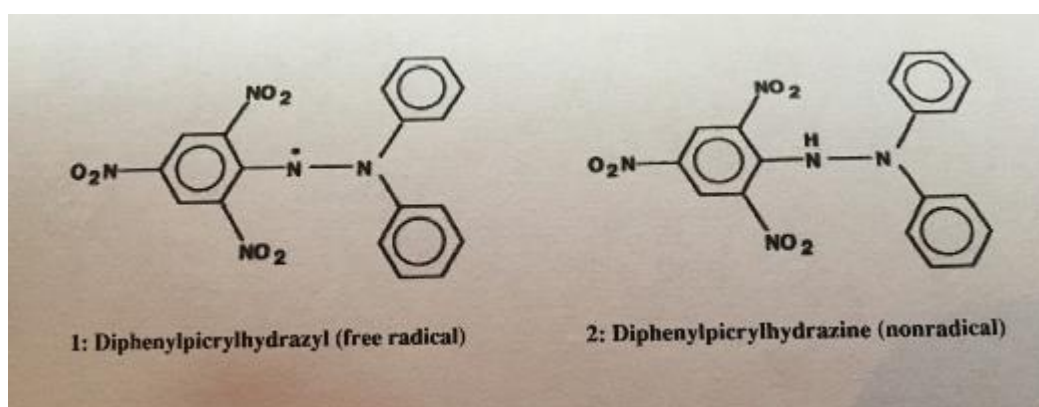


Рисунок 2.7.1–1: ДФПГ свободный радикал; 2: ДФПГ с присоединившимся водородом

После первичного взаимодействия АО с радикалом:

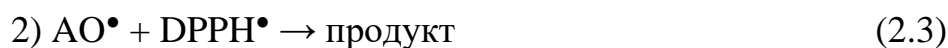


Предполагаются 2 варианта дальнейшего взаимодействия образовавшихся радикальных интермедиатов:

Рекомбинация интермедиатов между собой



Повторное взаимодействие с новой молекулой ДФПГ



В первом случае АРА будет соответствовать числу функциональных групп (т. е. 1 молекула АО с одной функциональной группой, ингибирует 1 молекулу ДФПГ радикала), по этому механизму реагируют следующие вещества: Аскорбиновая кислота, Мочевая кислота, Кофейная кислота, Катехин, Резорцин, Гидрохинон.

Во втором случае АРА будет превышать число функциональных групп в два раза (т.е. 1 молекула АО с одной функциональной группой, ингибирует 2 молекулы ДФПГ радикала), по этому механизму реагируют следующие вещества: Цистеин, Глутатион, α -Токоферол, Бутилокситолуол, Пирокатехин, Галловая кислота, Пирогаллол, Флороглюцин.

ДФПГ характеризуется как стабильный свободный радикал в силу делокализации свободного электрона над молекулой в целом. Темно-фиолетовый цвет, характеризующийся абсорбцией в растворе этанола, в диапазоне около 520 нм. Когда ДФПГ смешивается с веществом, которое может отдать атом водорода, это приводит к уменьшенной форме (2) с потерей фиолетового цвета, но с сохранением бледно-желтого цвета от группы пикрил. Метод ДФПГ введен Марсден Блуа, работавшем в Стэнфордском университете в 1958. Этот метод хоть и был описан в журнале Nature. В последние годы широко применяется для оценки антиоксидантной активности. Так как ДФПГ является стабильным свободным радикалом, нахождение его на свету должно быть сведено к минимуму, так как при воздействии света реакция начинает происходить очень быстро. Рекомендуется добавлять сам ДФПГ к исследуемым растворам в самом конце их приготовления. Этим методом мы проводили оценку антирадикальной активности рутина в свободно-радикальных реакциях со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ).

2.8 Приготовление раствора рутина для анализа его антирадикальной активности в реакции сДФПГ

Для анализа антирадикальной активности рутина был приготовлен ряд пробирок с разными концентрациями (таблица 2.8.1), которые затем подвергались облучению разными дозами.

Таблица 2.8.1– Внесение равных объемов рутина с разными концентрациями для получения исследовательских концентраций для реакции сДФПГ

Номер пробирки	Объём вещества(мл)	Вещество	ОбъёмДФПГ (мл)
1	2	Этанол 40%	2
2	2	Рутин 0,1 мМ в 40% этаноле	2
3	2	Рутин 0,05 мМ в 40% этаноле	2
4	2	Рутин 1 мМ в 40% этаноле	2
5	2	Этанол 96%	2

Таблица 2.8.2 – данные для эксперимента постэфект 0,05мМ 40%этанольных растворов, облучённых разными дозами

Номер пробирки	Доза, Гр	Объём 0,05мМ 40% этанольного раствора рутина	ОбъёмДФПГ (мл)
1	0	2	2
2	400	2	2
3	800	2	2
4	2000	2	2

2.9 Приготовление раствора нитрата серебра с добавлением экстрактов растений

Для изучения влияния солнечного света на синтез наночастиц серебра в пробирку добавляют 1 мл экстракта растения (1г на 100мл деионизированной H_2O) и 11,5 мл $AgNO_3$ 10^{-3} М, перемешивают полученный раствор (Рис. 2.9.1).

Измерение оптической плотности проводят на приборе СФ-2000. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду.



Рисунок 2.9.1 – Растворы 11,5 мл 10^{-3} М $AgNO_3$ с добавлением 1мл экстрактов растений

2.10 Приготовление экстрактов лекарственного растения багульника болотного в присутствии и в отсутствие ионов серебра и селена

Для приготовления экстракта багульника болотного взвешивают и измельчают навеску (0,5 г или 5 г), растворяют в дистиллированной воде в объеме 50 мл, тщательно перемешивают, троекратно нагревают на водяной бане в течение 30 мин и отфильтровывают с помощью бумажного складчатого фильтра. Экстракт готовили непосредственно перед экспериментом.

Для приготовления раствора $AgNO_3$ концентрацией 0,01 моль/л используют сухой порошок нитрата серебра массой 0,17 г, растворяют в 100 мл деионизированной воды и тщательно перемешивают.

Для приготовления раствора AgNO_3 концентрацией 0,001 моль/л раствор 0,01 моль/л разбавляют в 10 раз.

Для приготовления раствора Na_2SeO_3 концентрацией 0,001 моль/л используют сухой порошок селенита натрия, массой 0,173 г, растворяют дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Для приготовления раствора Na_2SeO_3 концентрацией 0,1 моль/л используют сухой порошок селенита натрия, массой 17,3 г, растворяют дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Синтез наночастиц серебра с багульником болотным при рентгеновском облучении: смешивают 2.5 мл водного раствора багульника болотного 1:100 с 47.5 мл 0,001 моль/л водного раствора AgNO_3 . Растворы были облучены 20 минут в дозе 3,6 кГр.

Синтез наночастиц серебра с багульником болотным при воздействии света: смешивают 2,5 мл водного раствора багульника болотного 1:100 с 47,5 мл 0,001 моль/л водного раствора AgNO_3 .

Синтез наночастиц селена с багульником болотным при воздействии света: смешивают 600 мкл водного раствора багульника болотного с 7,4 мл 0,001 моль/л водного раствора Na_2SeO_3 .

Синтез наночастиц серебра с багульником болотным при воздействии света: смешивают 600 мкл водного раствора багульника болотного с 7,4 мл 0,1 моль/л водного раствора Na_2SeO_3 .

2.11 Йодометрия в определении пероксида водорода

Для определения концентрации пероксида водорода среди продуктов радиолиза облучённого раствора применяется йодометрический метод [144-146]. Для этого к 1 мл исследуемого облучённого раствора добавляют 4 мл буферного раствора, состоящего из 0,1 М KI, 0,1М KH_2PO_4 и 0,05 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

К 0,5 мл исследуемого диоксана необходимо добавить 2 мл буферного раствора, состоящего из 0,1М йодида калия KI, 0,1М KH_2PO_4 и 0,05М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

В результате смешивания исследуемого и буферного растворов, будет протекать следующая реакция:

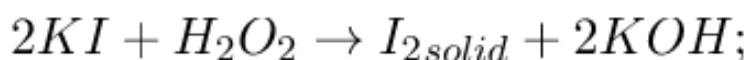


Рис. 2.11.1. Реакция взаимодействия перекиси и йодида калия.

Через 30 минут после смешивания количество образовавшегося йода может быть определено спектрофотометрическим методом при $\lambda=350$ нм. В качестве раствора сравнения для измерения использовался буферный раствор.

2.12 Методы исследования антирадикальной активности и радиопротекторных свойств фенольных систем

2.12.1 Метод спектрофотометрии

К задачам оптической спектроскопии относятся измерение интенсивности спектральных линий, анализ и описание процессов, которые участвуют в формировании спектров, а также интерпретацию спектров, описывающими физические объекты [52].

Способность вещества испускать свет вызвана переходами электронов из более высокого энергетического состояния в более низкое. При этом частота излучения является функцией разности энергий этих состояний. Следовательно, для наблюдения данного эффекта необходимо перевести исследуемое вещество в возбужденное состояние. Это возможно при помощи нагревания или облучения электромагнитным излучением. Измерения проведены на спектрофотометрах СФ-2000, Санкт-Петербург и КФК-2.

Эталоном сравнения служили выбранные растворители – вода, длина оптического пути кварцевой кюветы равна 1 и 10 мм.

Принцип действия спектрофотометра основан на измерении отношения двух световых потоков: светового потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец).

Расчет концентрации раствора через оптическое поглощение можно вести, используя закон Бугера-Ламберта-Бера

$$D = c \cdot \varepsilon \cdot l = \lg(I_0/I_c)$$

где c – концентрация измеряемого раствора, моль/л;

ε - коэффициент экстинкции, л/моль*м;

l – толщина кюветы, м;

I_0 , I_c – интенсивность света после прохождения исследуемого раствора с концентрацией частиц равной нулю и отличной от нуля.

Колориметры разделяются на визуальные и объективные (фотоэлектрические) – фотоколориметры. В визуальных колориметрах свет, проходящий через измеряемый раствор, освещает одну часть поля зрения, в то время как на другую часть падает свет, прошедший через раствор того же вещества, концентрация которого известна [184-186].

2.12.2 Метод оптической микроскопии

Метод микроскопии является простым и эффективным способом оценки жизнеспособности клеток, основанным на подсчёте количества живых и мёртвых дрожжевых клеток в образце [116].

Перед анализом каждая пробирка с исследуемой пробой тщательно встряхивалась, чтобы ресуспендировать дрожжевые клетки, осевшие на дно. Затем с помощью стеклянной палочки небольшое количество суспензии

наносилось на предметное стекло, после чего добавлялась капля метиленового синего – красителя, избирательно окрашивающего мёртвые клетки.

Образец исследовался под микроскопом. Метиленовый синий проникает через повреждённую клеточную мембрану и окрашивает мёртвые клетки в тёмный цвет, отчётливо выделяя их на фоне неокрашенных (живых) клеток.

Для получения достоверных результатов в каждом образце выбирали 10 различных микроскопических полей зрения и проводили подсчёт живых и мёртвых клеток. По итогам анализа рассчитывалось процентное соотношение мёртвых клеток к общему количеству клеток в поле зрения.

В качестве инструмента использовался микроскоп марки «ЛОМО», оснащённый объективом с увеличением 40х/0,65 160х/0,17, что обеспечивало достаточное разрешение для идентификации клеток.

2.12.3 Метод хроматографии

Установка для газо-жидкостных хроматографических исследований на базе хроматографа “Хроматэк – Кристалл 5000”

Комплекс предназначен для качественных и количественных анализов жидких и газообразных проб различных органических и некоторых неорганических соединений методом газовой хроматографии [42].

Области применения комплекса: контроль среды обитания человека, контроль лекарственных препаратов, обнаружение и определение алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ в биожидкостях и тканях человека, судебно-химическая экспертиза, а также в учебных, научно-исследовательских учреждениях.

Комплекс образует: газовый хроматограф с комплектом сменных детекторов и устройств ввода пробы; персональный компьютер; программное обеспечение; методики анализов; хроматографические колонки; дополнительные устройства (компрессор, генератор водорода, дозаторы и др).

Составная часть комплекса хроматографа дополнена следующими детекторами: пламенно – ионизационный детектор (ПИД); детектор по теплопроводности; масс-спектрометрический детектор.

Хроматограф обеспечивает газохроматографическое разделение и детектирование: жидких проб, вводимых микрошприцем или дозатором автоматическим жидкостным; газообразных проб, вводимых дозатором автоматическим газовым; сжиженных газов, вводимых краном-дозатором сжиженных газов; твердых проб, вводимых с помощью дозатора твердых проб или испарителя пиролитического.

Кумарин методом ГХ определяли² на колонке VF-5ms фирмы Varian (длина 60м диаметр 0.25мм толщина слоя 0.25 мкм). Поток газа носителя (гелий марки 6.0) 2 мл/мин. Детектирование вели с использованием пламенно – ионизационного детектора ПИД (температура 250 °С). Режим хроматографирования: 200 °С (4 мин), нагрев до 290 °С со скоростью 20 °С/мин, поток газа носителя (гелий марки 6.0) 2 мл/мин. Температурный режим: испаритель 250 °С, детектор (ПИД) 250 °С, термостат 200 °С (4 мин), нагрев до 290 °С со скоростью 20 °С/мин.

В работе применяли *метод внутреннего стандарта*. К раствору анализируемого вещества добавляется известное количество внутреннего стандарта — постороннего соединения, дающего на хроматограмме хорошо разрешенный пик. Концентрация определяемого компонента в анализируемом веществе рассчитывается по формуле:

$$C_i = \frac{S_i \cdot K_i \cdot M_{ст}}{S_{ст} \cdot M_n} \cdot 100, \text{ масс.}\%$$

где $S_{ст}$ – площадь пика стандарта; $M_{ст}$ – масса добавленного внутреннего стандарта; M_n – масса пробы анализируемой смеси, к которой добавлено определенное количество внутреннего стандарта.

² Работа выполнена при участии старшего преподавателя Фенина А.А., димпломницы Куракиной Е.В.

Приведенное уравнение может служить основой графического варианта рассматриваемого метода. Если $M_{ст}/M_n$ остается постоянным, тогда получают калибровочные графики в координатах: $C_i - \frac{S_i}{S_{ст}}$.

Требования к внутреннему стандарту. Внутренний стандарт должен иметь хорошо разрешенный пик, расположенный на хроматограмме рядом с пиками определяемых компонентов; иметь летучесть, близкую определяемым компонентам; отсутствовать в анализируемой смеси; хорошо растворяться в анализируемой смеси, не реагировать с другими компонентами пробы; добавляться в количестве, соизмеримом с анализируемыми компонентами.

Внутренний стандарт выбирается из числа соединений, близких по структуре и физико-химическим свойствам к компонентам анализируемой смеси [187].

Использование метода внутреннего стандарта в нашем исследовании на газожидкостном хроматографе дает возможность точного измерения параметра пика, уменьшает влияние изменения чувствительности детектора из-за колебаний рабочих условий (расход газа-носителя, температура колонки и т.д.), уменьшает ошибки, вызванные фракционированием пробы при вводе.

Ацетальдегид определяли при следующих условиях хроматографирования: колонка длиной 2 м внутренним диаметром 2 мм, заполненная Полисорбом-1 размером 0,1-0,25 мм. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Детектирование производилось на ПИД (температура 160 °С), расход воздуха 250 мл/мин, расход водорода 25 мл/мин. Расход газа носителя (гелий марки А) 30 мл/мин (9-10 мин), 40 мл/мин (13 мин), 30 мл/мин (0 мин). Температурный режим: термостат 70 °С (9мин), 40 °С/мин, 100 °С (0 мин), 240 °С (0мин), испаритель 150 °С.

2.12.4 Метод хромато-масс исследований

Работу проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC/MS, который находится на кафедре химия высоких энергий и радиоэкологии в РХТУ им. Д.И. Менделеева. Данный прибор используется для разделения смеси на чистые компоненты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [42].

Хроматограф имеет следующие составные элементы: автоинжектор - Sample Manager FTN, термостат - Column Manager, бинарный градиентный насос - Quaternary Solvent Manager, спектрофотометрический диодноматричный детектор - PDA еλ Detector, рефрактометрический детектор - Waters 2414 Refractive Index Detector, модуль нагрева колонок, тандемный квадрупольный масс-спектрометрический детектор - Waters Xevo TQD.

Основным конструктивным элементом хроматографа является колонка - трубка, заполненная неподвижной фазой, по которой во время выполнения анализа движется подвижная фаза и исследуемый образец. Именно в колонке происходит разделение компонентов исследуемой смеси.

Для подтверждения наличия в растворе кумарина использовали спектрофотометрический диодноматричный детектор. Он позволяет анализировать вещества, которые могут поглощать свет в ультрафиолетовой и видимой области, а это подавляющее большинство органических соединений.

Лампа видимого света, направляет свой пучок на первое зеркало, от которого свет, проходя через колонку и 2-ое зеркало, попадает на дифракционную решетку. Решетка раскладывает весь пучок света на спектр. Спектр попадает на диодную матрицу, состоящую из большого числа активных элементов, обеспечивающих оптическое разрешение 1,2 нм. Далее мы выбираем нужную нам длину волны, и компьютер нам выводит показания.

Оборудование - Waters ACQUITY UPLC/MS. Система снабжена менеджером бинарных растворителей, менеджером образцов, нагревателем колонки и фотодиодной матрицей еλ детектор, а также интерфейс тандемного квадруполь (TQD). Масс-спектрометр оборудован источниками ионизации

ESI/MS, элюирующий компонент колонки настроен в положительный режим ионизации для кумарина. Обработка и объединение данных производилась с помощью программного обеспечения Empower 2.

MS сканирование велось в диапазоне 100-1000 Да, N₂- сухой распыляющий газ, аргон- коллизионный газ. Скорость потока N₂ для десольватирования - 1000 л/час. Температура источника 150⁰С и температура десольватации 500⁰С. Оптимизация условий ионизации основана на интенсивности масс-сигналов протонирования. Напряжение капилляра 2,5 В, напряжение на конусе скиммера 40 В; энергия столкновения - 20 В. Образец вводили в масс-спектрометр с помощью хроматографа. Детектирование кумарина производилось на 270 нм. Температура термостатирования колонки для кумарина 40⁰С. Элюцию проводили в изократическом режиме - 70% Н₂О с 0,1% НСООН, В- 30 % ацетонитрил. Скорость потока 0,4 мл/мин.

Квадрупольный масс-анализатор служит для разделения ионов по их соотношению массы к заряду (m/z), которое в свою очередь определяется траекториями движения ионов, задаваемым переменным электрическим полем. Данный детектор работает в диапазоне масс: 2–2048 m/z .

По капилляру 1 элюент из хроматографа попадает в камеру, где происходит его распыление за счет поддерживаемого в камере вакуума. Капельки жидкости оказываются в потоке азота, и происходит осушение капель от элюента, в результате чего заряд капли оказывается на анализируемом соединении. Заряженные частицы за счет электростатического притяжения попадают в конус 2, где поддерживается постоянное напряжение 46 В. Большая часть потока остается незаряженной и опускается, а меньшая часть потока проходит через конус, в котором повторно разделяются нейтральные атомы от ионов. Оставшиеся заряженные частицы через экстрактор 3 попадают в ионизационную камеру 4, которая ускоряет образующиеся ионы. Далее находится первый квадруполь 5, схема которого представлена.

Квадруполь масс-спектрометрического детектора состоит из четырех параллельных стержней (монополя) круглого или гиперболического сечения.

Противоположные стержни электрически попарно соединены и находятся под напряжением, складывающимся из компоненты постоянного тока U и высокочастотной компоненты $V\cos(\omega t)$. Вторая пара стержней имеет равную по величине, но противоположную по знаку компоненту постоянного тока, а фаза высокочастотной компоненты сдвинута на 180° .

Ионы, вводимые в промежуток между полями с помощью небольшого ускоряющего напряжения (10-20 В), под действием электрического поля колеблются относительно осей x и y с возрастающей амплитудой, сохраняя направление движения вдоль электродов. Ионы, получившие большую амплитуду, могут нейтрализоваться на электродах.

При определенных соотношениях напряжений U/V , специфичных для каждого значения отношения массы к заряду, ионы соответствующей массы будут иметь ограниченную амплитуду колебаний и, двигаясь вдоль электродов, попадут в выходную щель. Таким образом, из полного потока ионов выделяется первичный ион с определенным m/z . Далее идет кализионная ячейка 6, в которой первичный ион входе соударений с аргоном распадается на дочерние ионы, которые попадают во второй квадруполь 7. Далее ионы с определенным отношением m/z поступают на чувствительный элемент – динод 8 (электрод в фотоумножителе), усиленный сигнал поступает на детектор 9.

Условия ВЭЖХ-анализа кумарина: методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Waters в изократическом режиме (колонка UPLC ВЕН, стационарная фаза C18 1.7, размер μm 21×10 nm). Подвижной фазой в анализе служила смесь ацетонитрила и воды различных соотношений с добавлением 0,1% ортофосфорной кислоты. Скорость потока при анализе составляла 300 мкл/мин. Детектирование кумаринов осуществляли при аналитической длине волны $\lambda_{\text{max}} = 270$ нм.

Для обнаружения возможных сопутствующих веществ использовали дополнительные длины волн: 220, 310, 330 нм. Условия анализа: изократический режим – 15% ацетонитрила, 85 % деионизованной воды с 0,1% ортофосфорной

кислоты. Ацетонитрил производства J.Becker марки “охч”, деионизованная вода и ортофосфорная кислота марки “х.ч.”

Условия проведения хроматографического анализа гидразона ацетальдегида [183]: контролируют качество раствора 2,4-ДНФГ путем постановки и хроматографирования “холостого” опыта. Проводят идентификацию пика ацетальдегида.

Для определения выхода ацетальдегида использовали спектрофотометрический диодноматричный детектор. Он позволяет анализировать вещества, которые могут поглощать свет в ультрафиолетовой и видимой области, а это подавляющее большинство органических соединений.

Методом обращенно-фазовой на хроматографе Waters ACQUITYU HPLC/MS в изократическом режиме (колонка UPLC ВЕН, стационарная фаза C18 1.7, размер μm 21×10 mm). Подвижной фазой в анализе служила смесь ацетонитрила и воды в соотношении 60:40. Скорость потока при анализе составляла 300 мкл/мин. Детектирование осуществляли при аналитической длине волны $\lambda_{\text{max}} = 270$ нм. Температура термостата колонки 35°. Время анализа 8 мин. Эффективность колонки не ниже 3000 теоретических тарелок.

2.12.5 Метод флуориметрии

При флуориметрических исследованиях производится измерение спектральных характеристик возбуждения и/или испускания люминесценции исследуемых объектов в момент воздействия импульсов возбуждающего света [41].

При исследовании задержанной люминесценции (фосфоресценции) анализируется кинетика затухания свечения при заранее выбранных условиях возбуждения и регистрации люминесценции. Дискретность изменения параметров кинетических изменений 0.05 мкс. Максимальная длительность измерительного строба 8000 мкс.

При фотометрических исследованиях проводятся измерения спектральных характеристик поглощения зондирующего излучения в анализируемых объектах.

Спектральные области в каналах возбуждения и регистрации люминесценции анализатора задаются встроенными светосильными монохроматорами. Монохроматоры управляются независимо. Аналитик может запрограммировать любую функцию их состояний в процессе измерения, в частности, можно проводить синхронное сканирование спектров. Оригинальная оптическая схема обеспечивает высокую чувствительность прибора, особенно в ультрафиолетовой области спектра, где фильтровая спектральная селекция затруднена.

Исследование проведено на приборе “Флюорат-Панорама-02”, г. Санкт-Петербург. Управление прибором осуществляется от внешнего компьютера, либо со встроенной клавиатуры. Математическая обработка результатов измерений осуществляется средствами поставляемого программного обеспечения или иными программными продуктами.

2.13 Облучение. Дозиметрия

2.13.1 Установка для стационарного радиолiza РХМ-γ-20

Радиационно-химическая радиобиологии многокамерная установка РХМ-γ-20 предназначена для проведения научных исследований в области химии, физики твердого тела, и др., в проточных, циркуляционных и статических условиях при температуре от -40 до $+560$ $^{\circ}\text{C}$ и давлении от 1 мПа [87, 91].

Конструкция установки, которая может быть размещена в обычном служебном помещении, обеспечивает биологическую защиту обслуживающего персонала.

Установка представляет собой свинцовый контейнер, устанавливаемый на станине. В центре контейнера расположен облучатель типа “беличье колесо” с 30 источниками ^{60}Co , с максимальной мощностью поглощенной дозы ионизирующего излучения $0,111 \pm 0,079$ Гр/с. Объект облучения для исследований устанавливается на рабочий столик пробки и механизмом подъема опускается в зону облучения. После облучения пробка поднимается вверх, и объект облучения извлекается из рабочей камеры. Верхняя часть пробки выполнена с козырьком, который предназначен для размещения тягового шарнира, посредством которого пробка присоединяется к Т-образному ползуну механизма подъема. Помимо центральной ($V=4,4$ л) установка имеет шесть боковых камер ($V=0,6$ л). В данной работе облучение проводилось в центральной камере.

Радиопротекторную активность экстрактов донника и багульника оценивали³ по относительному изменению выхода ионов калия из облученных дрожжевых клеток в питательную среду [188]. Дрожжи выращивали в течении двух дней при температуре $27-29^\circ\text{C}$ на глюкозо-аммонийной среде следующего состава: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,0 г, KH_2PO_4 – 0,85 г, K_2HPO_4 – 0,15 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, NaCl – 0,1 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г, глюкоза – 20 г, дистиллированная вода – 1000 мл. Используемая синтетическая среда не содержала ионов 3-d элементов, что позволило оценить их влияние на протекторную активность исследуемых соединений. Выращенную биомассу дрожжей переносили в стерильный раствор глюкозы (среда, не содержащая ионов K^+), для этого ампулы с суспензированными дрожжами центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а дрожжи ресуспендировали в растворе глюкозы с концентрацией 20 г/л. Процедуру очистки повторяли трехкратно. Концентрация дрожжей составляла $\sim 10^5$ КОЕ/мл. После очистки в 10 мл суспензии вводили исследуемые кумаринсодержащие вещества в

³ Работа на рН-метре и дальнейшая обработка результатов выполнена при поддержке аспирантки Николаевой В.В.

концентрации 10^{-5} моль/л в виде водных растворов с концентрацией 10^{-3} моль/л. Дрожжи подвергали воздействию γ -излучения ^{60}Co на установке РХМ- γ -20, облучали в дозе 0,45 кГр и измеряли, через сутки после облучения, концентрацию K^+ с помощью калий-селективного электрода (Россия) на рН ионометре “Экотест 2000” (Россия). Концентрацию K^+ в растворе дрожжей, облучённых без добавок, принимали за 100%.

2.13.2 Рентгеновское облучение

Рентгеновское излучение - электромагнитные волны с длиной волны от 100 до 10^{-3} нм. Основным свойством рентгеновских лучей является их способность проникать в вещества, теряя при этом, в той или иной степени, свою интенсивность.

Облучение образцов проводили в РХТУ им. Д.И. Менделеева на рентгеновской установке, в которой установлена рентгеновская трубка 5БХВ6 – W с неполной защитой от неиспользуемого рентгеновского излучения, с одним рабочим пучком излучения, мощность поглощенной дозы равна 3 Гр/с (при рабочих параметрах 50 мА, 40 кВ), определенной по дозиметру Фрикке [189].

Генератором рентгеновского излучения служит рентгеновская трубка, являющаяся основным элементом аппарата. Рентгеновская трубка – электровакуумный прибор для получения рентгеновских лучей. Простейшая рентгеновская трубка состоит из стеклянного баллона с впаянными электродами – катодом и анодом (антикатодом). Электроны, испускаемые катодом, ускоряются сильным электрическим полем в пространстве между электродами и бомбардируют анод. При ударе электронов об анод их кинетическая энергия частично преобразуется в энергию рентгеновского излучения. Рабочая поверхность анода расположена под некоторым углом к направлению электронного пучка, для того чтобы создать требуемое направление рентгеновских лучей. В рентгеновское излучение превращается примерно 1 %

кинетической энергии электронов. Остальная часть энергии выделяется в виде тепла, поэтому рабочая поверхность анода выполняется из тугоплавкого материала.

Поглощенная доза - количество энергии E , переданное веществу излучением любого вида пересчете на единицу массы m любого вещества:

$$D = dE/dm, \text{ (Дж/кг)}.$$

Мощность поглощенной дозы - отношение приращения поглощенной дозы dD за время dt :

$$P = dD/dt \text{ Гр/сек, рад/сек}$$

Облучение дрожжей *S. cerevisiae T-985* и *S. carlsbergensis*

Для эксперимента были взяты девятые пассажи и контрольная группа, которая не была адаптирована к облучению. Микроорганизмы были высеяны в жидкую питательную среду. Через сутки в новую культуру была добавлена перекись водорода, после чего, через четыре часа культуры снова пересеяли в новую среду. По истечению 12 часов были подготовлены пробы каждой адаптированной культуры и контроля для различных доз облучения: 400 Гр, 800 Гр и 2000 Гр. Для детального исследования от каждой линии было представлено по три пробы для каждой дозы облучения.

Приготовленные дрожжи были облучены на установке рентгеновского излучения модели КАЛАН– 4 при мощности 3 Гр/с по дозиметру Фрике.

Облучение каждого вида дрожжей проходило по двум сценариям: при избыточном содержании кислорода или недостаточном (гипоксия). Также были взяты разные дозы облучения с целью выявить зависимость результата от дозы. Объем всех облучаемых проб составлял 1 мл.

В случае, когда требовалось провести облучение образца при избытке кислорода, проба 1 мл отбиралась из общей колбы в высокую стеклянную пробирку. Пробирка слегка прикрывалась сверху ваткой во избежание попадания в пробирку инородных объектов (например, частиц пыли). Непосредственно перед облучением пробирка встряхивалась для поднятия

дрожжевого осадка и увеличения объема дрожжей, подвергаемых действию ионизирующего излучения. Пробирка помещалась в рентгеновскую установку и проводилось облучение.

В случае, когда требовалось провести облучение образца при недостатке кислорода, проба 1 мл отбиралась из общей колбы и помещалась в стеклянную микропробирку. Микропробирка помещалась в рентгеновскую установку и проводилось облучение.

Для обнаружения последствий ионизирующего излучения и сравнения получившихся результатов с контрольным образцом использовалось измерение оптической плотности и метод микроскопии. Все измерения проводились спустя 3 часа после облучения. Это время было выбрано для того, чтобы микроорганизмы успели отреагировать на повлиявшее на них излучение. Также при работе с культурами регистрировался пост-эффект. Изменения в поведении дрожжей рассматривались, так называемый пост-эффект, рассматривался спустя 1 день после облучения. При рассмотрении пост-эффекта регистрировалась и оптическая плотность, и процент отмерших клеток.

Измерение оптической плотности проводилось лабораторным спектрометром. Для корректной работы спектрофотометра проба дрожжевой образец разбавлялся в 5 раз. Это делалось для того, чтобы показатели попадали в «зону видимости» прибора. При работе использовались две кюветы. В одну из кювет набиралась чистая дистиллированная вода, и под нее настраивался прибор. Во вторую кювету набиралась проба, оптическую плотность которой нужно было измерить. При этом пробирку с дрожжевой взвесью необходимо было встряхнуть, чтобы осевшие на дно дрожжи распределились по объему. Регистрация оптической плотности проводилась при длине волны 540 нм.

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ РЕАКЦИОННО-АКТИВНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ЭКСТРАКТОВ ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ИССЛЕДОВАНИЕМ ИХ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ И РАДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

3.1 Спектрофотометрическое исследование экстрактов лекарственных растений и различных антиоксидантов

Спектрофотометрическое исследование позволяет качественно подтвердить наличие активных веществ в экстрактах растений. Известно [30, 75], что к общим свойствам кумаринов можно отнести их плохую растворимость в холодной воде и хорошую растворимость в органических растворителях – хлороформе, диэтиловом эфире, этиловом спирте и других. Методы спектрофотометрии позволяют идентифицировать по максимумам поглощения состав экстрактивных веществ [4, 186, 187, 190]. Спектры оптического поглощения растворов травы донника лекарственного и багульника болотного в воде, диэтиловом эфире, изопропаноле и этилацетате представлены на рисунках 3.1.1 и 3.1.2 соответственно [10].

3.1.1 Спектрофотометрическое исследование исходных экстрактов донника, багульника, муррайи в различных растворителях

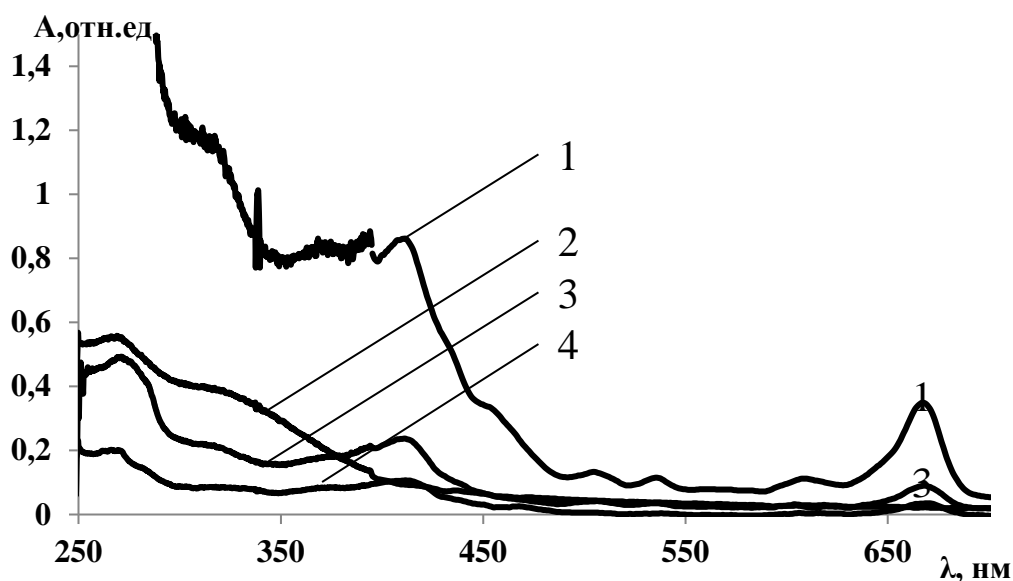


Рисунок 3.1.1 – Спектры оптического поглощения экстрактов травы донника лекарственного в различных растворителях: 1 – диэтиловым эфиром, 2 – водой, 3 – этилацетатом, 4 – изопропанолом

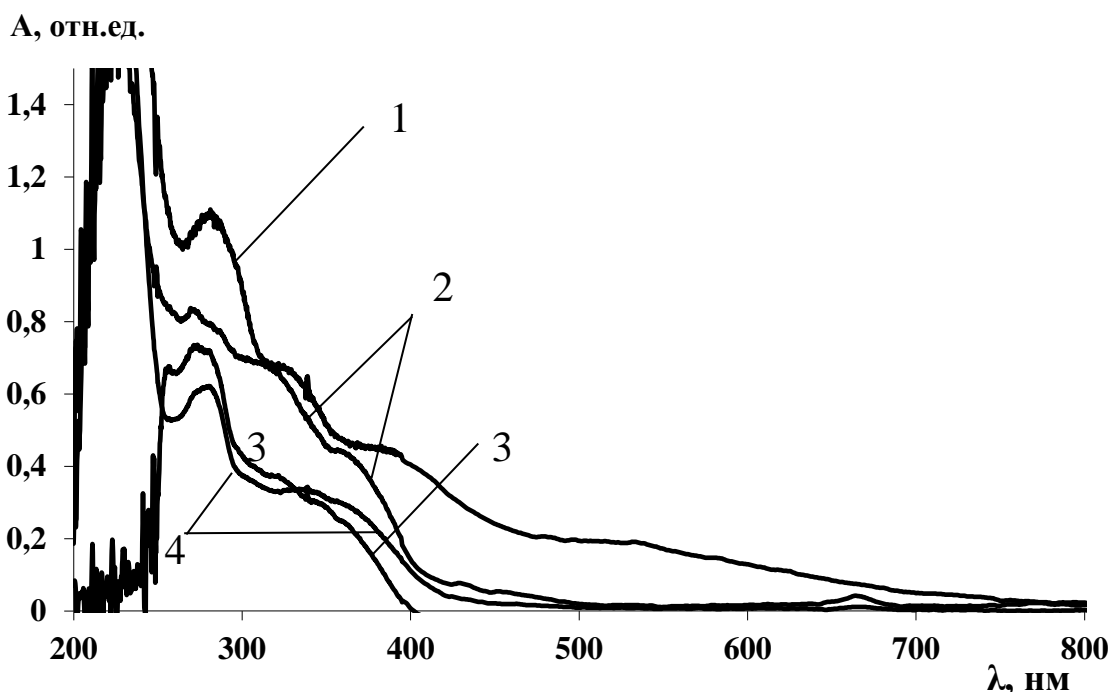


Рисунок 3.1.2 – Спектры оптического поглощения экстрактов побегов багульника болотного в различных растворителях: 1 – водой, 2 – диэтиловым эфиром, 3 – этилацетатом, 4 – изопропанолом

Как видно из рисунка 3.1.2, спектр диэтилэфирного экстракта багульника болотного содержит интенсивные полосы поглощения: 265 нм (простые фенолы), 310 нм (кумарины, оксibenзойные кислоты, флавоны) и 600–700 нм (хлорофилл). Наличие этих же характерных максимумов в спектрах экстракта донника лекарственного (таблица 3.1.1, 3.1.2) свидетельствует о том, что диэтиловый эфир обеспечивает полноценную экстракцию БАВ из данного растения.

Таблица 3.1.1 – Максимумы оптической плотности экстрактов багульника болотного в разных растворителях

растворитель	Измерения при длине оптического пути 10 мм		Измерения при длине оптического пути 1 мм	
	λ , нм	A, отн.ед.	λ , нм	A, отн.ед.
вода	269,3 315 379,9	1,135 0,725 0,457	-	-
диэтиловый эфир	245,9 264,1 280,7 Плечо 351,5 423,8 657,9	0,976 0,804 0,789 0,45 0,073 0,033	-	-
2-пропанол	267 Плечо 340,1	0,725 0,332	277,1 336,3	0,618 0,391
этилацетат	272,2 253,5	0,725 0,628	267,4 243,8 Плечо 332,4	0,103 0,150 0,055

В случае остальных растворителей, используемых для экстракции из выбранных лекарственных растений, видно, что интенсивность спектральных линий снижается у донника лекарственного, по сравнению с багульником болотным, это показано в таблицах 3.1.1 и 3.1.2.

Таблица 3.1.2 – Максимумы поглощения и значения оптической плотности в данных максимумах экстрактов донника лекарственного в разных растворителях. Измерения проведены при длине оптического пути 10 мм

растворитель	λ , нм	A, отн.ед.
диэтиловый эфир	273	1,196
	317,5	0,836
	407,5	0,857
	Плечо 449	0,345
	502,7	0,131
	532,7	0,082
	664,5	0,337
этилацетат	267	0,483
	404,3	0,227
	663,6	0,083
2-пропанол	219,8	0,686
	Плечо 254,4	0,191
	405,1	0,009
	462,8	0,022
	660,4	0,027
вода	200,3	1,51
	260,2	0,542
	Плечо 312,4	0,4

Спектры этилацетатных экстрактов имеют полосы поглощения 267 нм и 284 нм с дополнительными максимумами 360 нм и 320 нм, соответственно, принадлежащие флавононам и флавонолам. Полосы 405 нм, 430 нм и 450 нм показывают присутствие ауранов. Также присутствуют полосы, подтверждающие присутствие хлорофилла, это полосы 532 нм и 505 нм, а также 665 нм, 650 нм и 650 нм. На примере спиртового раствора кумарина рассмотрим разделение сложных спектров полос поглощения на основные индивидуальные полосы, которое произведено по Гауссу [37].

Ниже представлен спектр (рис.3.1.3) [37] полос поглощения кумарина в координатах оптическая плотность – волновое число:

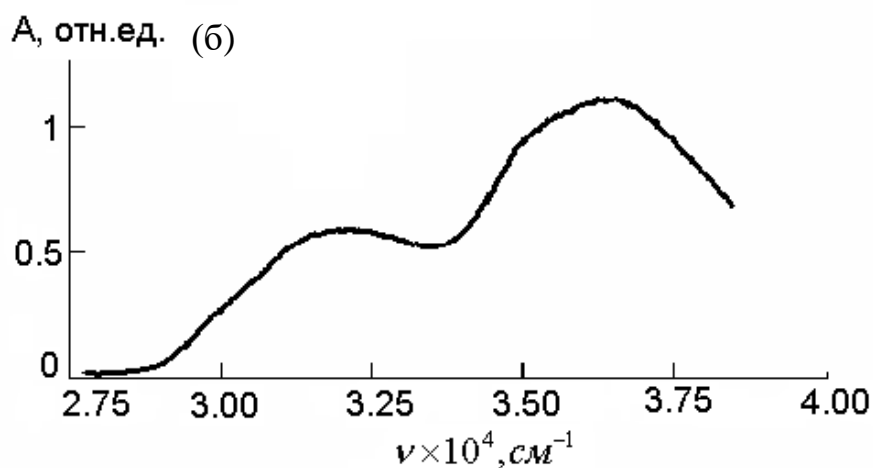


Рисунок 3.1.3 – Спектр поглощения спиртового раствора кумарина в координатах оптическая плотность – волновое число

Путем математических процедур определены⁴ индивидуальные полосы оптического поглощения в исходных спиртовых растворах кумарина [37].

На рис. 3.1.4 изображены гауссианы полос оптического поглощения кумарина в спирте.

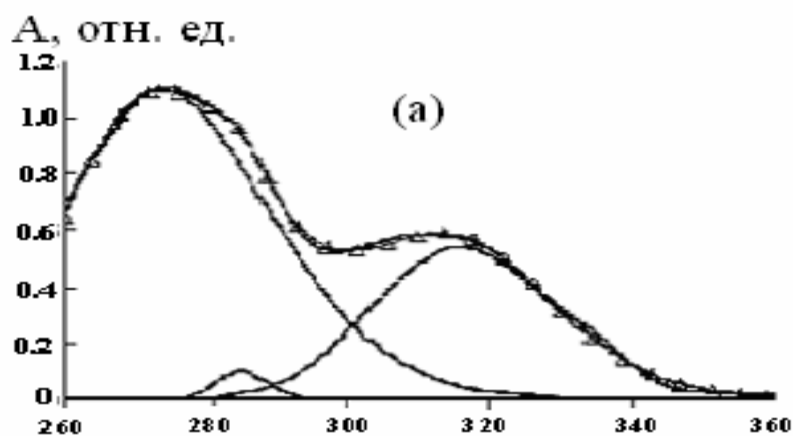


Рисунок 3.1.4 – Разложение суммарного оптического спектра кумарина на индивидуальные полосы:

△△△ - гауссовая форма линий,

— - индивидуальные полосы.

⁴ Работа по расшифровке спектров поглощения выполнена при поддержке инженера каф. ХВЭиРЭ Танасюк Д.А.

Из рассмотрения рис. 3.1.4 следует, что в спектре кумарина [191, 192] обнаружены две интенсивные полосы поглощения с $\lambda_{\max} = 274$ нм, $\lambda_{\max} = 315$ нм и третья полоса с $\lambda_{\max} = 285$ нм.

По такой же методике, как и для кумарина, разложили спектры оптического поглощения экстрактов травы донника лекарственного и побегов багульника болотного в 40% этаноле в ограниченном спектральном интервале от 200 нм до 400 нм (рис. 3.1.5).

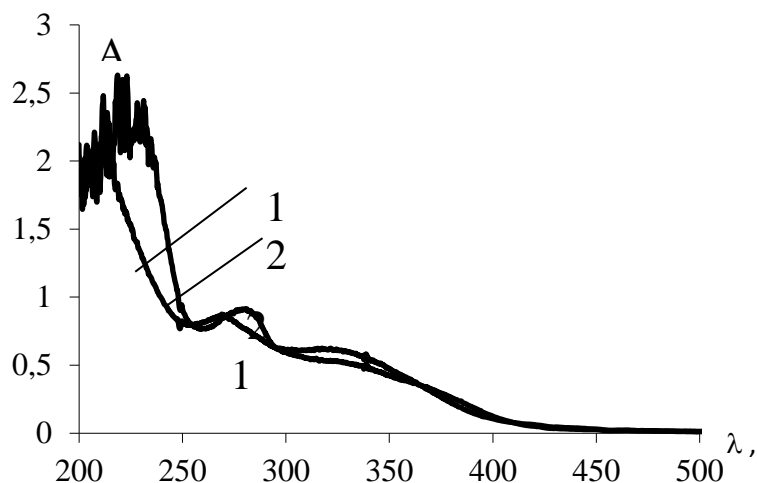


Рисунок 3.1.5 – Исходные спектры экстрактов багульника болотного и донника лекарственного в 40 % спирте: 1 – донник (10 мг/мл), 2 – багульник (4 мг/мл). Длина оптического пути 1 мм

Как видно, концентрация экстрагируемых биологически активных веществ в этанольном растворе неодинакова. Из этого мы делаем вывод, что активные вещества в багульнике экстрагируются полнее. Разложение на индивидуальные полосы произведено в волновых числах, но для наглядности представлены в координатах оптическая плотность-длина волны (рисунки 3.1.6 и 3.1.7).

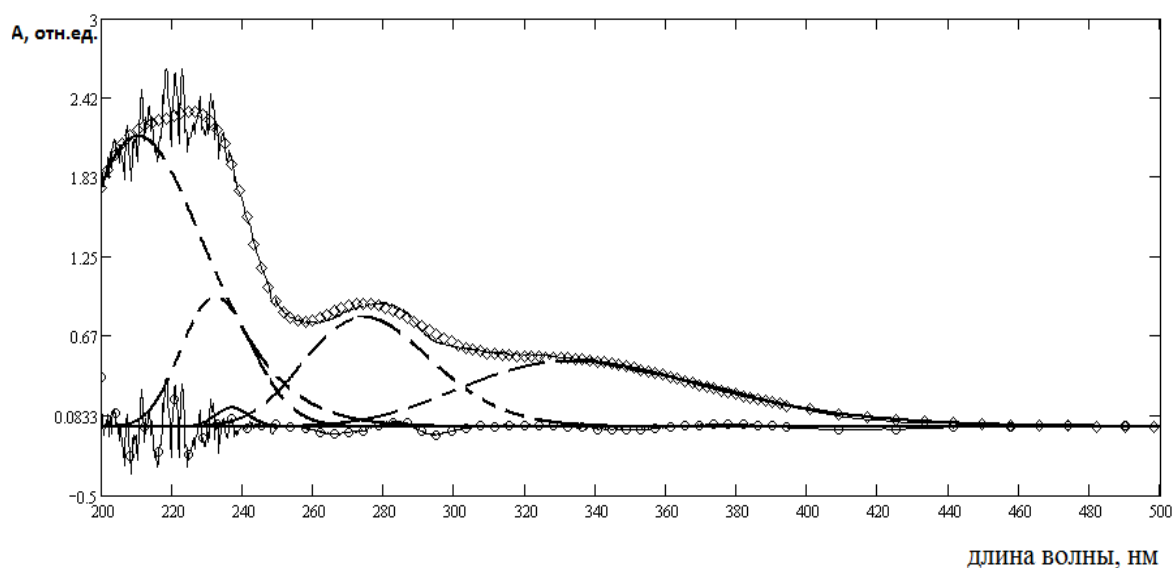


Рисунок 3.1.6 – Разложение оптического спектра багульника болотного на гауссову линию $\triangle\triangle\triangle$ и индивидуальные полосы

В таблице 3.1.3 приведены результаты измерения спектральных характеристик донника лекарственного и багульника болотного, с разными концентрациями растворителя.

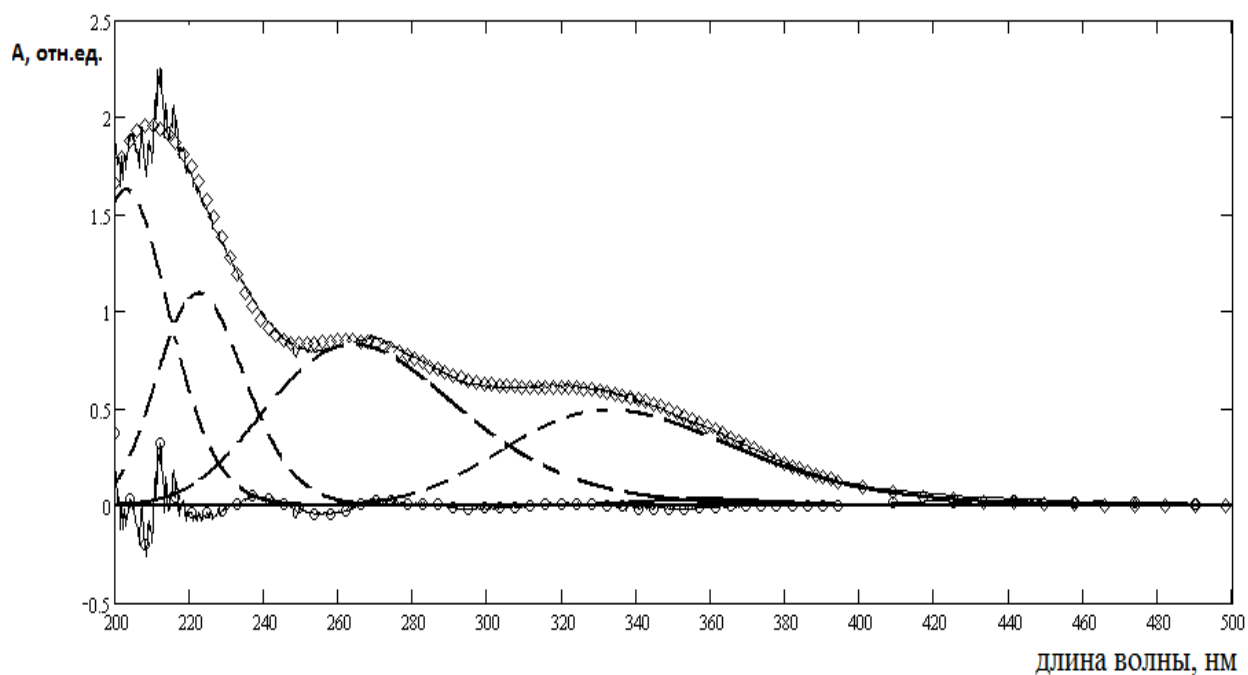


Рисунок 3.1.7 – Разложение оптического спектра донника лекарственного на гауссовую линию $\triangle\triangle\triangle$; - - - индивидуальные полосы

Таблица 3.1.3 – Спектральные характеристики донника лекарственного, с концентрацией 10 мг/мл растворителя, и багульника болотного, с концентрацией 4 мг/мл

Соединение	λ_{max} , нм	Площадь под кривой, $S \times 10^5$	Полуширина, см^{-1}	Амплитуда
Простые фенолы и кумарин — багульник болотный	274 и 333	48	0,000336	0,805
		37	0,000437	0,483
— донник лекарственный	264 и 333	76	0,000519	0,828
		34	0,000391	0,490

При сопоставлении обработанных данных по доннику и багульнику наблюдается расхождение данных оптического спектра в максимумах исследуемых соединений. Максимум полосы, соответствующий простым фенолам, в багульнике смещен в длинноволновую область относительно максимума, который присутствует в доннике.

Однако максимумы поглощения, указывающие на присутствие кумарина, и в том, и в другом лекарственном растении, совпадают. Из этого следует предположение, что в экстрактах обоих растений присутствуют производные кумарина одинакового состава.

Далее представлен спектр оптического поглощения спиртовых экстрактов муррай метельчатой (рис. 3.1.8), приготовленный из высушенных листьев муррай в 40%-ном этаноле. Измерения проведены при длине оптического пути 10 мм.

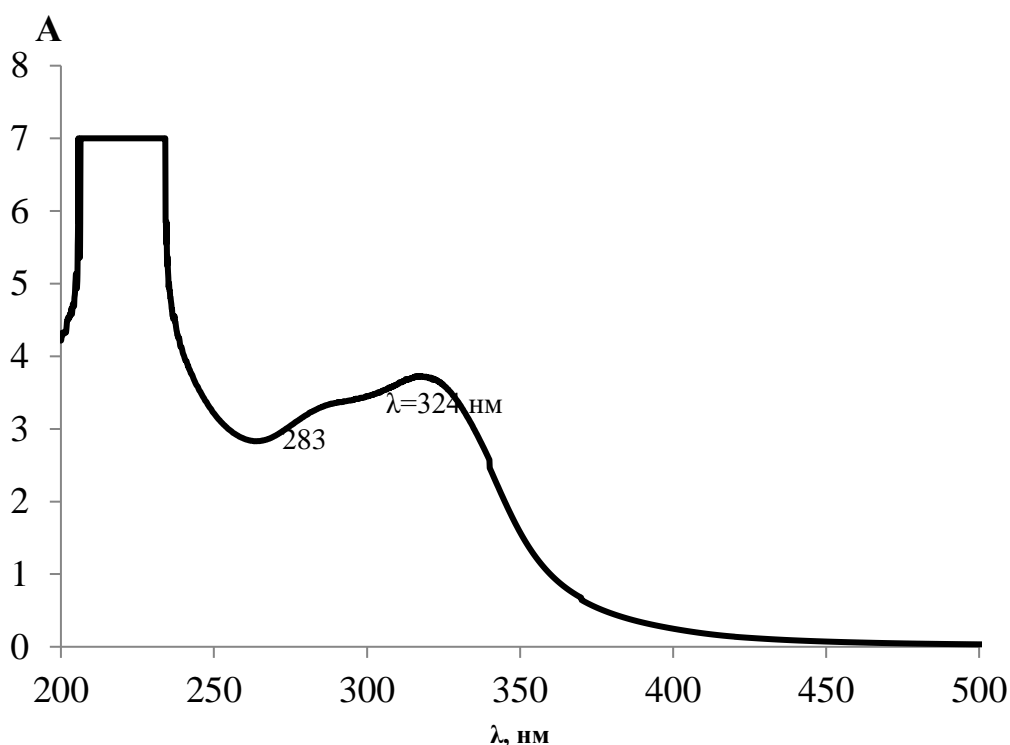


Рисунок 3.1.8 – Спектры оптического поглощения муррайи в 40% этаноле. Концентрация муррайи 50 мг/мл растворителя. Длина оптического пути 10 мм

На спектре отчетливо видны максимумы при длинах волн 283 нм и 324 нм. Наличие этих полос свидетельствует о присутствии простых фенолов, кумаринов, флавонов и оксибензойных кислот. Данные. При хранении спиртовых экстрактов в темноте 16 суток изменений в спектре поглощения не зарегистрировано, что позволяет сделать вывод о их стабильности во время хранения.

Экстракцию побегов багульника болотного производили в спиртовых растворах с разным объёмным содержанием этанола, спектры оптического поглощения представлены на рис. 3.1.9. По экспериментальным данным максимумы оптического поглощения соответствуют фенолам (270 нм) и кумаринам (310 нм). Самое интенсивное поглощение соответствует 40 % этанольному раствору багульника.

Ниже представлен график содержания активных компонентов в багульнике в зависимости от процентного содержания этанола. Для ауруонов

(391,4 нм) и флавонов (410 нм) содержание веществ не изменяется от процентного содержания этанола, для простых фенолов (282,1 нм) и кумаринов (331 нм) представлена полиномиальная зависимость второго рода, что свидетельствует о том, что процесс экстракции активных соединений в багульнике происходит различно, и что она полнее протекает при использовании 40%-ного этанола.

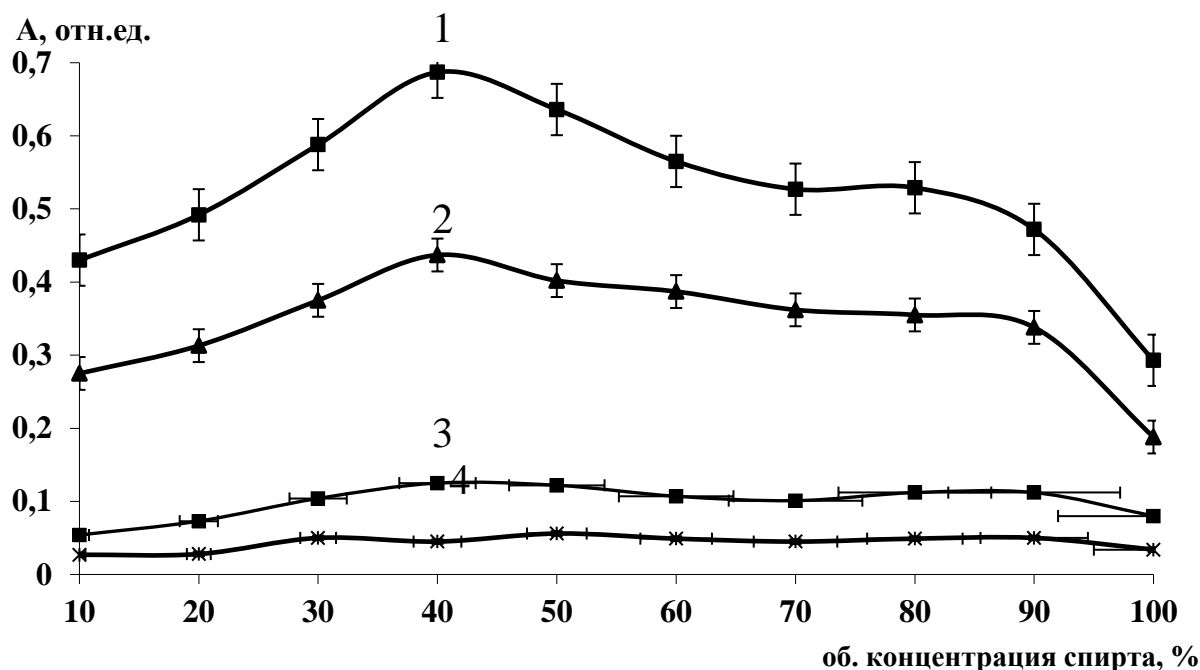


Рисунок 3.1.9 – Изменения оптической плотности при определённых длинах волн исходных водно-спиртовых экстрактов багульника болотного:
1–282,1 нм, 2 – 331 нм, 3 – 391,4 нм, 4 – 410 нм

На следующем этапе работы было рассмотрено поведение экстрактов при воздействии ионизирующего излучения.

3.1.2. Спектрофотометрические исследования изменений в экстрактах донника, багульника, муррайи в различных растворителях после воздействия ионизирующего излучения

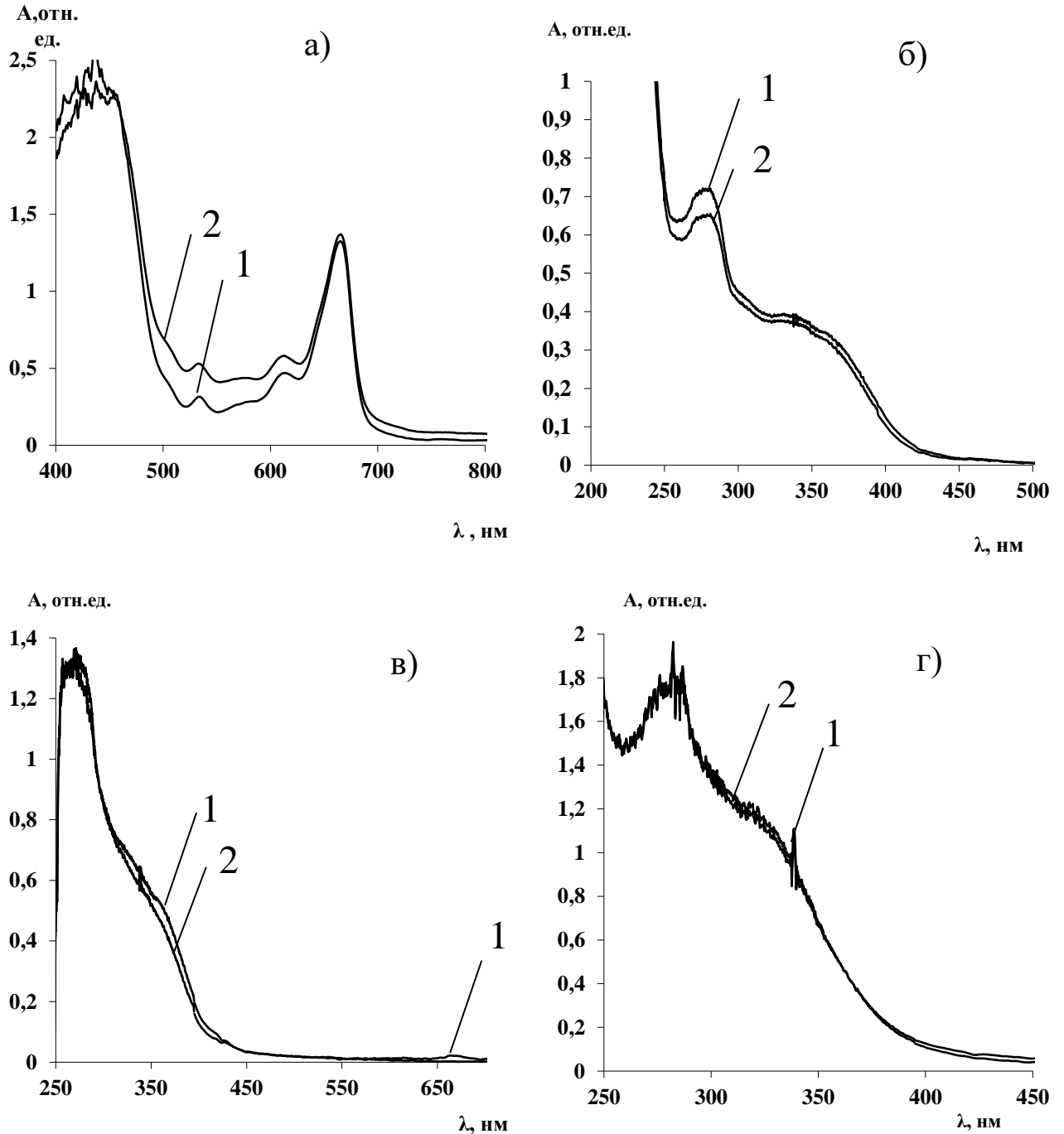


Рисунок 3.1.10 – Изменение спектров поглощения аэрированных экстрактов багульника болотного (1 – исходный, 2 – облученный $D=0.6$ кГр) в различных растворителях: а) - в диэтиловом эфире; б) - в изопропаноле; в) - в этилацетате; г) - в воде

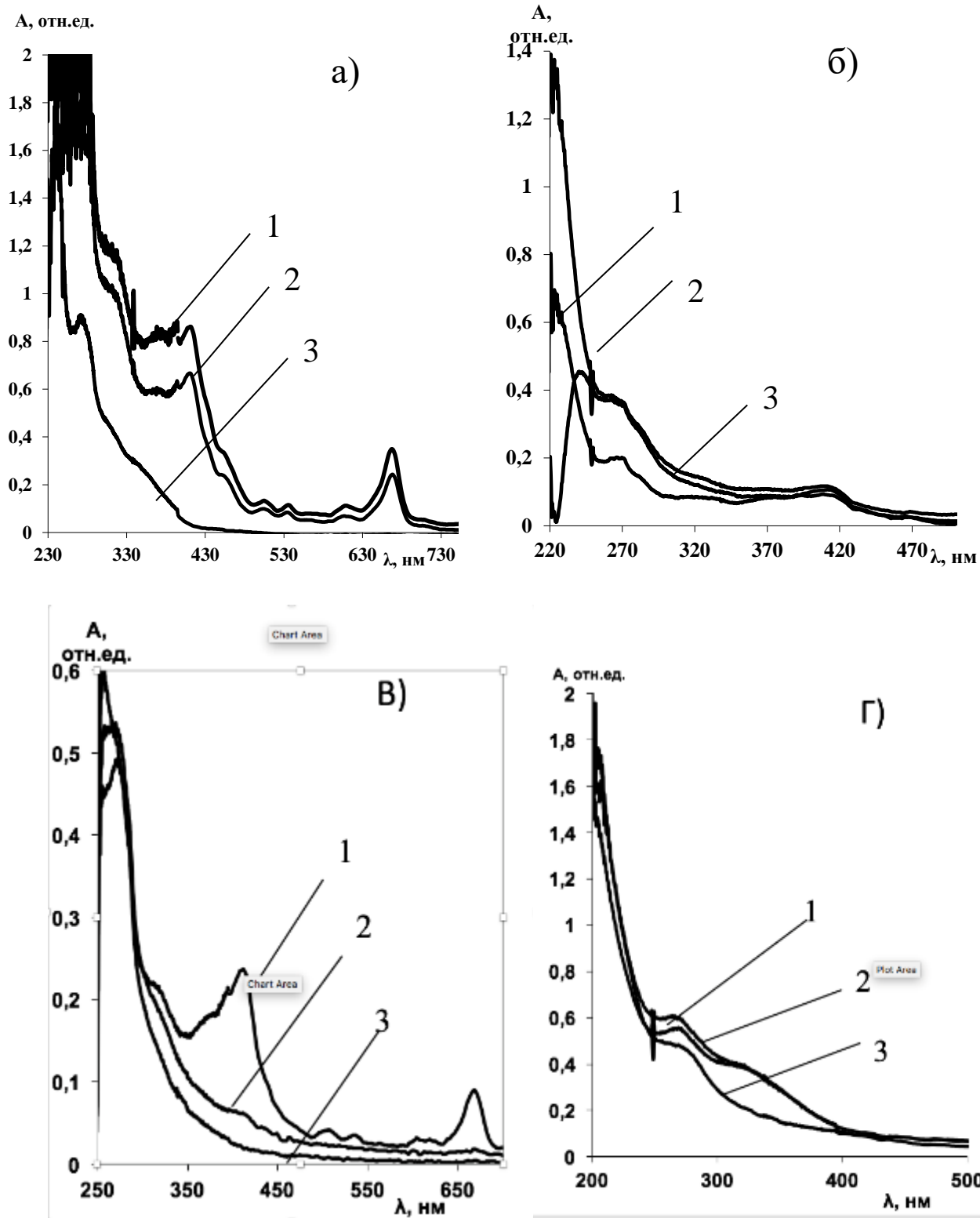


Рисунок 3.1.11 – Изменение спектров поглощения аэрированных экстрактов донника лекарственного 1 – исходный раствор, 2 – D= 1,2 кГр, 3 – D= 6,6 кГр в различных растворителях: а) - в диэтиловом эфире; б) - в изопропанолe; в)- в этилацетате; г) - в воде

Спектральное сравнение радиационной чувствительности багульника и донника показало, что багульник не сильно претерпевает изменения в данных растворителях в аэрированных условиях, в то время как донник лекарственный в диэтиловом эфире и этилацетате при $D=1,2$ кГр радиационно-чувствителен, при воздействии на систему $D=6,6$ кГр зарегистрирована убыль экстрагируемых веществ в диэтиловом эфире, этилацетате и воде. Интересно отметить, что в случае использования изопропанольного экстракта происходит увеличение интенсивности полосы оптического поглощения от дозы, соответствующая образованию новых продуктов. В облученных растворах полоса поглощения в водных растворах, отнесенная к кумаринам, при воздействии ионизирующего излучения $D = 6,6$ кГр исчезает, что подтверждает антиоксидантное свойство кумаринсодержащих экстрактов. Тогда как полоса поглощения при 270–275 нм, принадлежащая простым фенолам, практически не претерпевает изменений. Реакционная способность водных экстрактов связана с возможностью взаимодействовать с гидроксильными радикалами, генерированными в водных растворах под действием ионизирующего излучения [214].

Показано, что если экстракцию муррайи проводить из свежесобранных листьев, то можно свидетельствовать о высокой радиационной чувствительности компонентов в экстракте. Зарегистрирована радиационная стойкость к действию ионизирующего излучения до дозы облучения 2 кГр. При воздействии ионизирующего излучения в дозе 17 кГр наблюдается уменьшение концентрации всех экстрагируемых веществ (рис. 3.1.12).

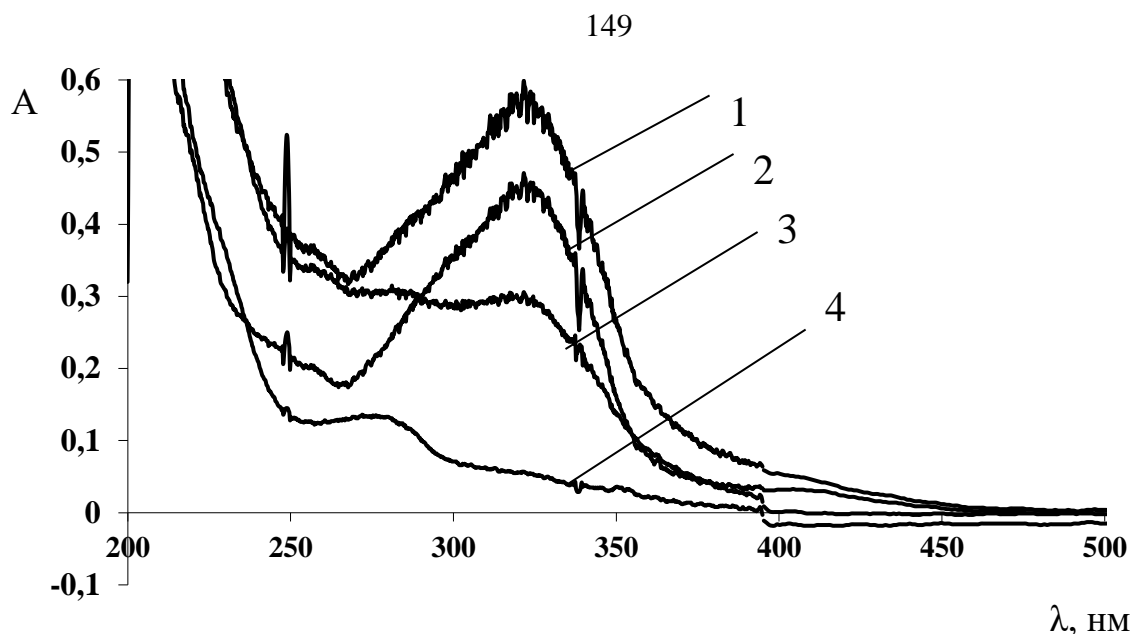


Рисунок 3.1.12 – Изменения спектров оптического поглощения экстрактов муррайи, приготовленных из свежесобранных листьев и высушенных образцов в 70% этаноле: 1 – исходный экстракт муррайи из сухих листьев, 2 – исходный экстракт муррайи из свежесобранных листьев, 3 – экстракт муррайи из высушенного сырья после облучения дозой 17 кГр в аэрированных условиях, 4 – экстракт муррайи из свежесобранных листьев после облучения дозой 17 кГр в аэрированных условиях.

3.1.3 Исследования изменений в составе экстрактов донника и багульника в 40% растворе этанола

Результаты экспериментов по воздействию ионизирующего излучения на водно-спиртовые экстракты донника и багульника представлены на рис. 3.1.13. На рис. 3.1.13 видно, что значение оптической плотности при аналитических длинах волн 270 нм и 310 нм с увеличением дозы уменьшается как в экстрактах донника, так и багульника. При облучении дозой до 2 кГр явных изменений не зарегистрировано. Это подтверждается защитным влиянием на подобные системы молекулярного кислорода. В пост - радиационный период 40 % раствора в дозе 2 кГр (время после облучения составило 12 суток) нет изменений в спектрах оптического поглощения, система стабильна. Можно предположить,

что наибольшая активность предполагаемых экстрактов багульника и донника наблюдается только для диапазона доз от 2–6 кГр.

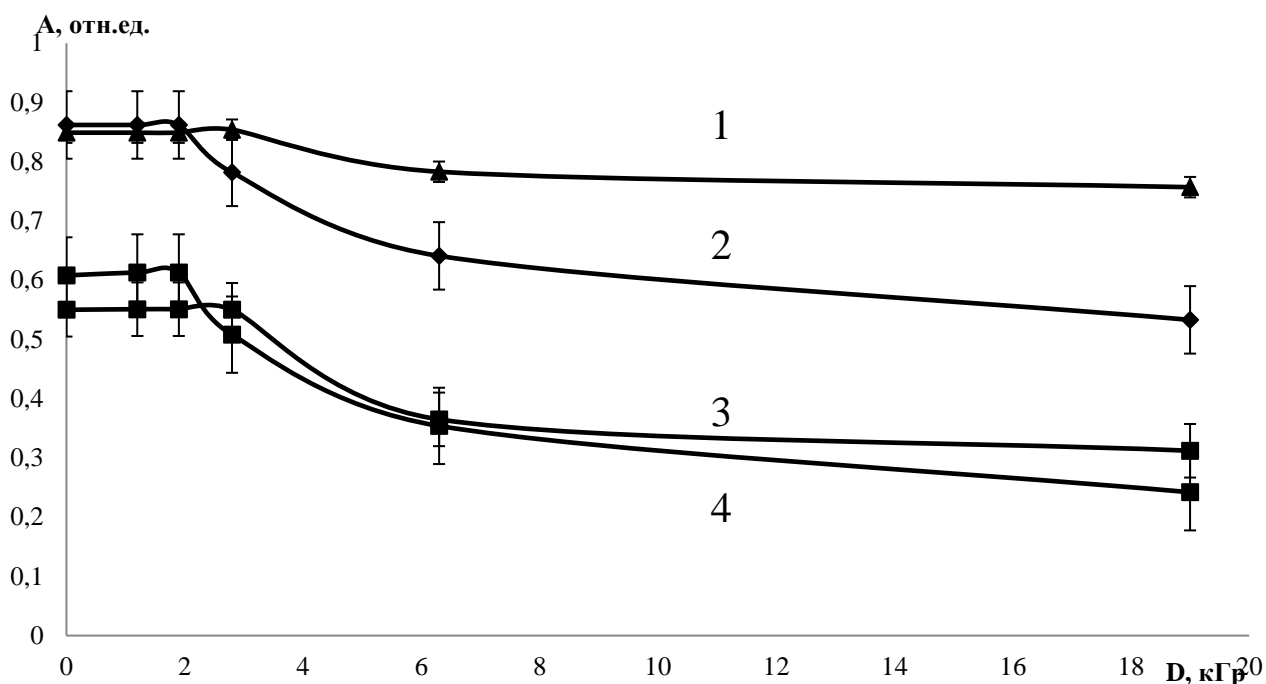


Рисунок 3.1.13 – Изменения оптической плотности при длинах волн 270 нм и 310 нм аэрированных растворов донника и багульника в 40% этаноле от дозы облучения.

1 – багульник (270 нм), 2 – донник (270 нм), 3 – багульник (310 нм), 4 – донник (310 нм).

Из рисунка 3.1.13 видно, что донник лекарственный более радиационно-чувствителен, чем багульник.

Расчет степени превращения производился по формуле:

$$\frac{D_{\text{лусх.}} - D_{\text{лоблуч.}}}{D_{\text{лусх.}}} = X, \% \quad (3.1)$$

Расчет относительного изменения оптической плотности производился при аналитической длине волны 333 нм. В зависимости от концентрации сырья меняется поведение экстрактивных веществ, точнее относительный процент извлечения и расходования активного соединения.

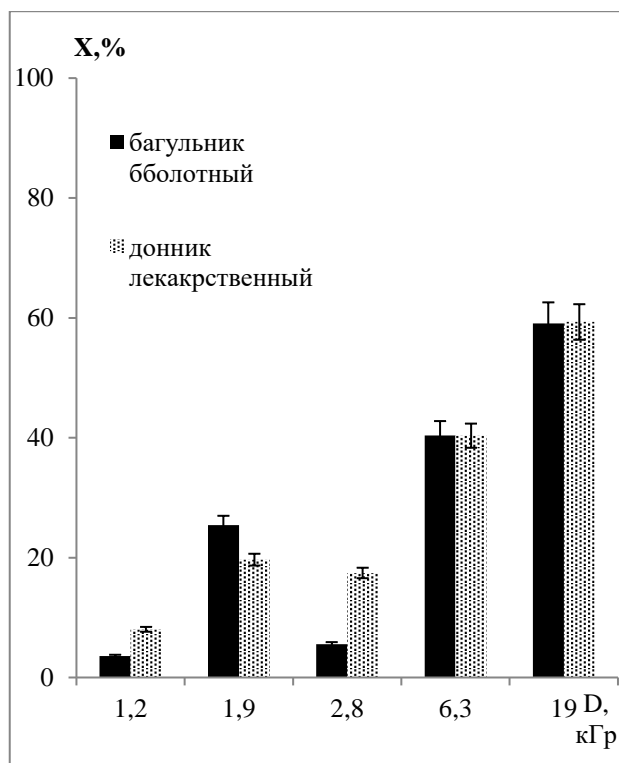


Рисунок 3.1.14 – Относительное изменение оптической плотности 40% водноспиртового экстракта багульника и донника при разных дозах облучения. Концентрация раствора 0,2 г на 100 мл

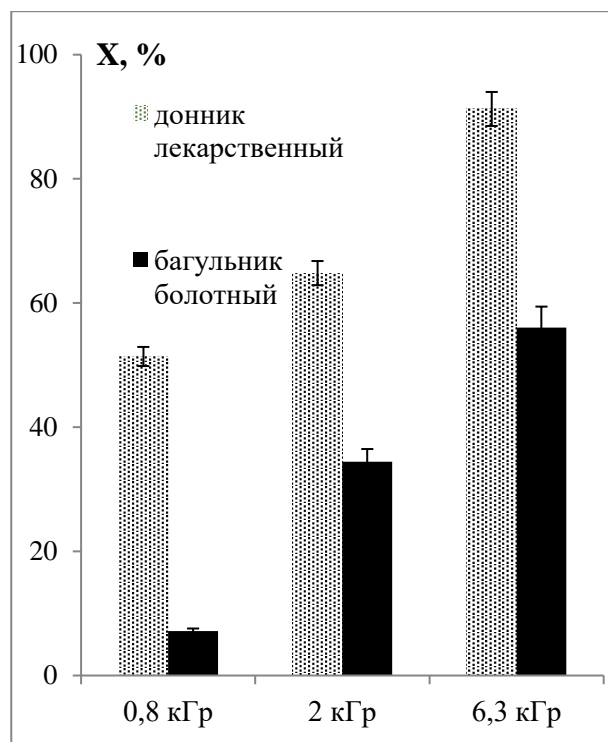


Рисунок 3.1.15 – Относительное изменение оптической плотности 40% водно-спиртового экстракта багульника и донника при разных дозах облучения. Концентрация раствора 0,02 г на 100 мл

3.1.4 Исследования радиационно-химических превращений ионола в этаноле под действием рентгенолучей

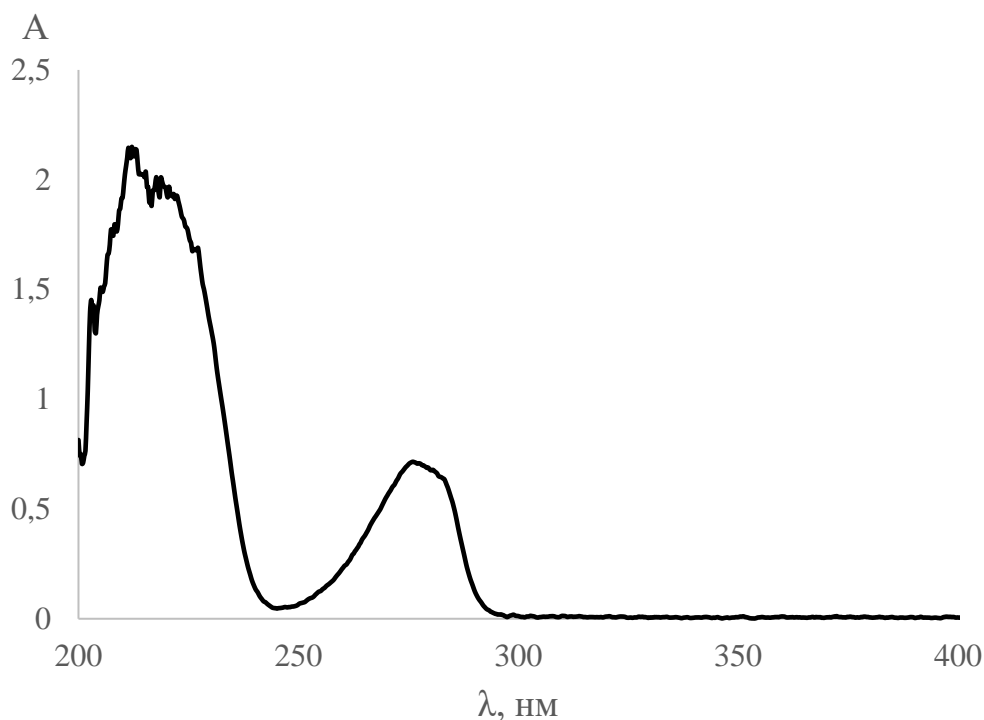


Рисунок 3.1.16 – Спектр оптического поглощения этанольного раствора ионола с концентрацией 5×10^{-4} моль/л. Длина оптического пути 10 мм

На спектре оптического поглощения этанольного раствора ионола мы наблюдаем максимумы с длиной волны $\lambda=213$ нм и оптической плотностью $D=2,14$, и длиной волны $\lambda=276$ нм и оптической плотностью $D=0,71$. Рассчитан коэффициент экстинкции ионола по формуле (3.4).

$$\varepsilon = \frac{D}{l \cdot c} = \frac{0,71}{1 \cdot 5 \cdot 10^{-4}} = 1420 \frac{\text{л}}{\text{МОЛЬ} \cdot \text{СМ}} \quad (3.2)$$

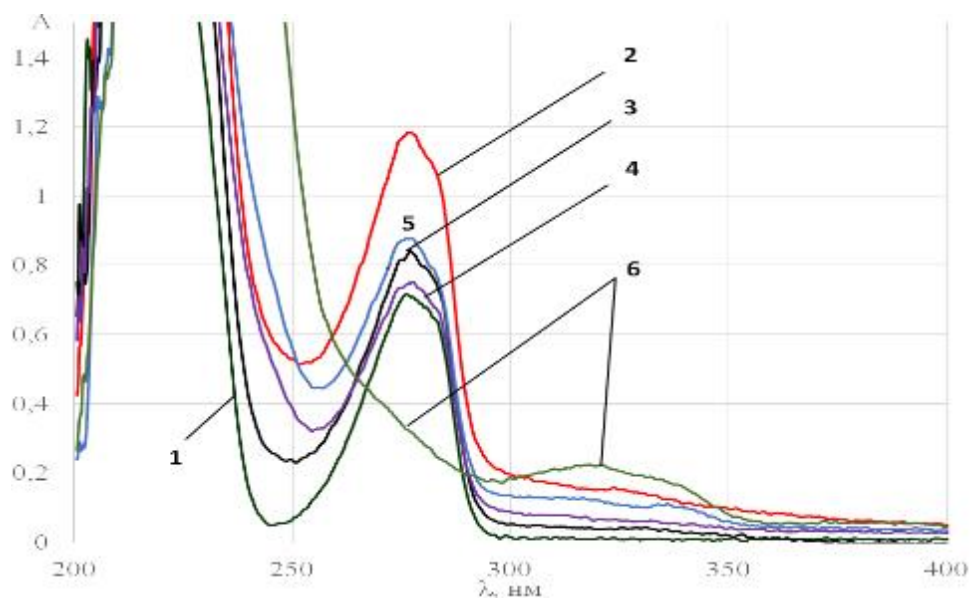


Рисунок 3.1.17 – Спектры оптического поглощения этанольного раствора ионола с концентрацией 5×10^{-4} моль/л в зависимости от дозы (Гр): 1 – 0, 2 – 180, 3 – 360, 4 – 540, 5 – 960, 6 – 900

Было показано, что в растворе с концентрацией 0,5мМ ионола в этаноле, зарегистрировано образование и накопление продуктов окисления ионола при длинах волн 250 нм и 320 нм. На рис. 3.1.18 представлены спектры оптического поглощения ионола в этаноле. Наблюдаем увеличения интенсивностей полос поглощения при длинах волн 250 нм и 320 нм, в данной части образуются продукты радиационно-химического превращения ионола. Дальнейшие хроматографические исследования будут проведены при данных длинах волн.

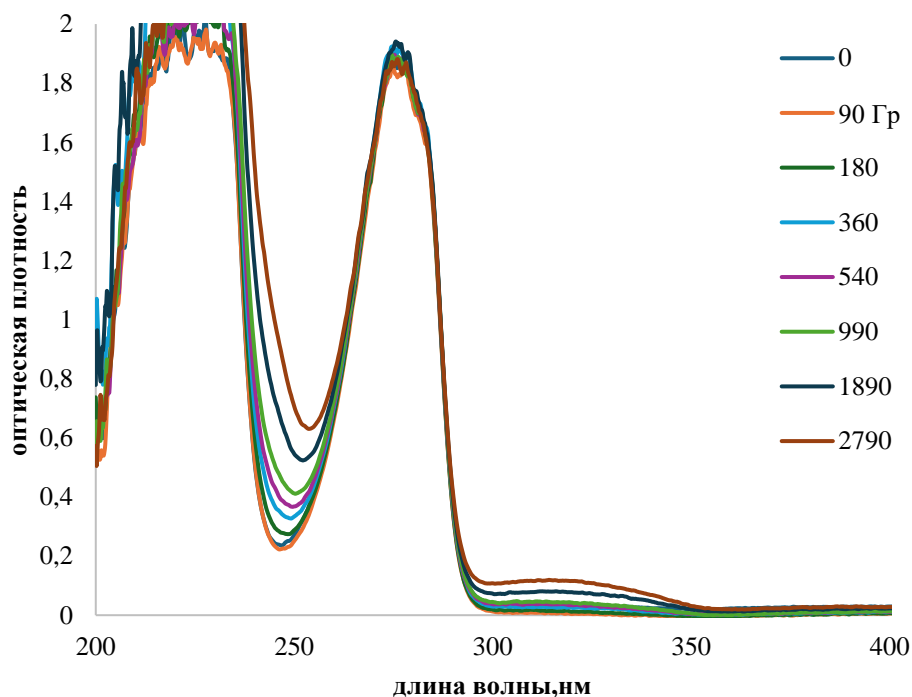


Рисунок 3.1.18 – Изменения спектров оптического поглощения 1 мМ ионола в спирте от дозы облучения

На рисунке 3.1.18 показаны спектры оптического поглощения 1 мм ионола в этаноле. Зафиксировано увеличение интенсивностей полос поглощения на длинах волн 250 нм и 320 нм, это связано с образованием новых продуктов радиационно-химического превращения ионола. Основным продуктом радиолитического превращения ионола является продукт со временем хранения 0,51 минуты. При радиолитическом превращении ионолом после облучения в дозе 1 кГр было зафиксировано наличие двух продуктов со временем удерживания 0,63 мин и 0,51 мин. Их оптические спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометрического диодно-матричного детектора (Рис 3.1.19.).

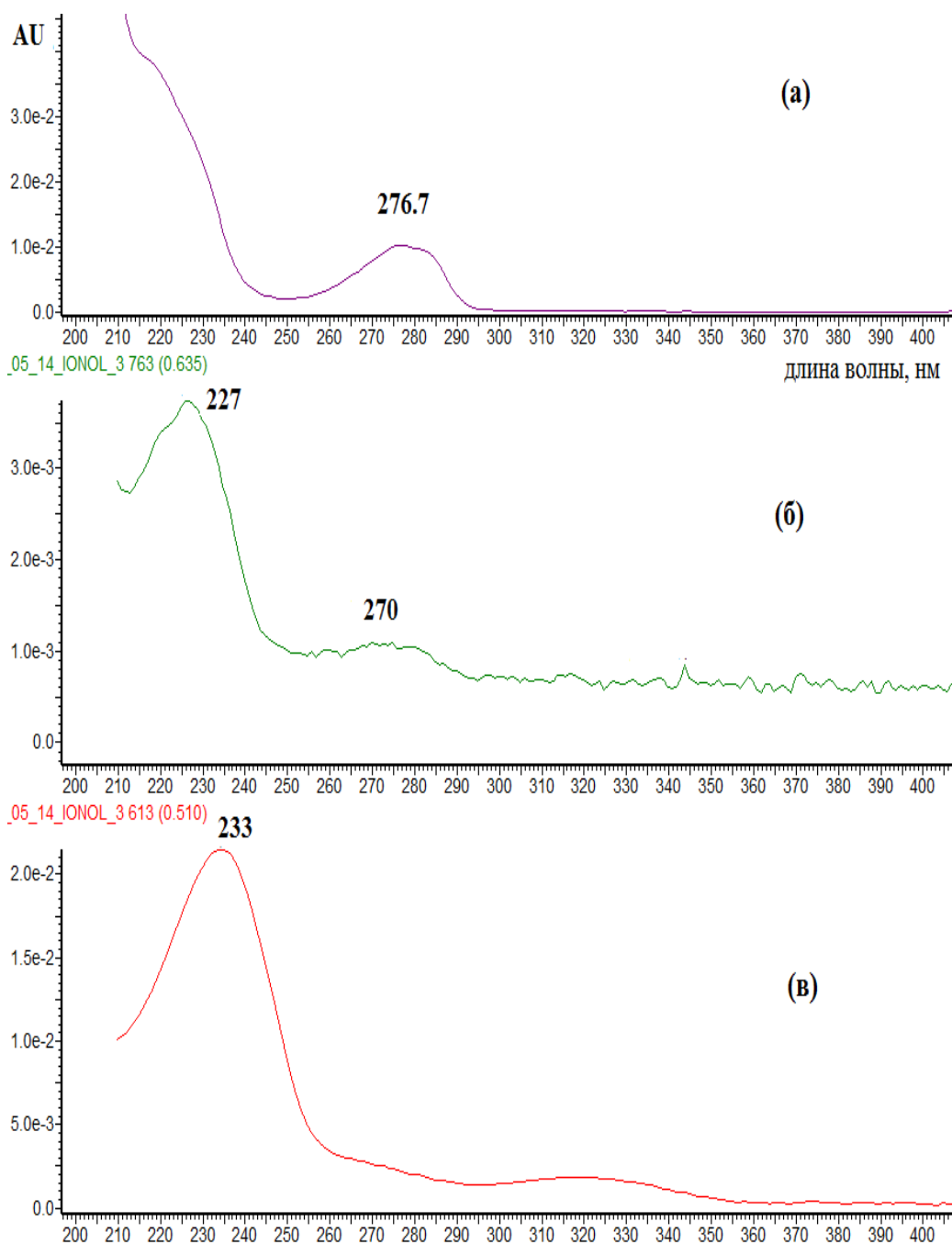


Рисунок 3.1.19 – Спектры оптического поглощения (а) при концентрации 0,001 мл/л и продуктов его радиолита (б) со временем удерживания 0,63 мин, (в) со временем удерживания 0,51 мин

Хроматографические исследования показывают образование продуктов радиолита ионола со временем удерживания 0,51–0,63 мин. Получены спектры поглощения продуктов радиолита ионола является синтетическим веществом и хорошо известен в клинических и биологических исследованиях как сильный

антиоксидант, антиканцерогенное средство и радиопротектор, а также уменьшает количество перекиси водорода и гидроксильных радикалов, образующихся при воздействии ионизирующего излучения.

В работе использовали небольшую концентрацию ионола, равную 0,001 моль/л. Прямое действие излучения направлено на растворители с образованием большого количества химически активных радикалов и перекисей, усиливающих процессы окисления. Продолжительность жизни первичных радикалов не превышает долей секунды, а вновь образованные окислители существуют длительное время [211]. Кислород может вступать в реакцию с некоторыми ионизированными молекулами и способствовать их изменению, которое могло бы не проявиться в отсутствие кислорода. Увеличивая интенсивность первичных реакции, развивающихся под влиянием облучения, кислород повышает радиочувствительность клетки, причем повышение это наступает мгновенно вслед за увеличением содержания кислорода. Следовательно, для повышения эффективности разрушения радиацией раковых клеток, злокачественные клетки следует насыщать кислородом. Противоположное действие – снижение радиочувствительности тканей – оказывают протекторы- вещества, связывающие кислород и радикальные группы и тем самым подавляющие развитие реакции непрямого действия. Поэтому здоровые клетки должны находиться в условиях гипоксии (недостаток кислорода). Введение кислорода после облучения способствует более быстрому восстановлению их после лучевого воздействия. Фенольные соединения – перспективные источники противолучевых средств. Также надо обратить внимание, что в системе присутствует кислород, который усиливает эффективность образования продуктов радиолиза, а также обладающих окислительными свойствами – пероксидные радикалы, а также перекиси. Наличие кислорода воздуха связано с кислородным эффектом, так как мы используем в работе облучение излучением (рентгеновское) с малой линейной передачей энергии.

Антиоксидантное действие складывается из антиокислительной и антирадикальной активности, последние из которых обусловлена реакцией с пероксидными радикалами.



Радиационно-химические выходы ионола, равные $0,36 \pm 0,02$ молекулы на 100 эВ, были рассчитаны по уравнению (3.4).

$$G_{(-\text{ВНТ})} = \frac{9.65 \cdot 10^9 \cdot C_{\text{ВНТ}}}{\rho \cdot D}, \quad (3.4)$$

где $C_{\text{ВНТ}}$ - концентрация ВТН, моль/л; ρ - плотность растворителя, г/л; D - поглощенная доза, Гр.

Их антиоксидантная активность проявляется в перехвате свободных радикалов и снижении радиационно-химического выхода ВНТ.

3.1.5 Спектрофотометрическое исследование свободно-радикальных реакций рутина

Спектрофотометрический метод основан на использовании свободного стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила (ДФПГ). Для работы был приготовлен свежий 0,2 мМ раствор ДФПГ ($M_{\text{ДФПГ}} = 394,33$) в 96% этаноле. В контрольные пробирки вместо раствора рутина вносили 2 мл 96% раствора этанола. Реакция начинается при добавлении раствора ДФПГ. В контрольном опыте вместо рутина в реакционную систему вводили чистый этанол. Пробирки хорошо встряхивали, помещали в темноту при комнатной температуре. Измерения проводили в течение 30 минут с интервалом 5 минут при длине волны 517 нм, чтобы проследить динамику связывания радикалов ДФПГ растворами рутина [213].

Спектры оптического поглощения этанольных растворов рутина.

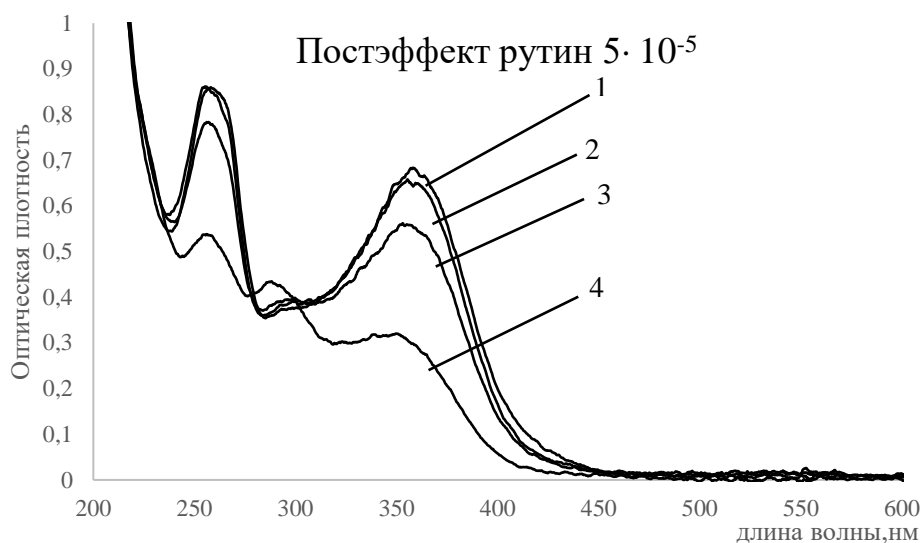


Рисунок 3.1.20 – Спектры оптического поглощения спиртового раствора рутина концентрацией $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ при разных дозах поглощения: 1 – Rut/EtOH исходный; 2 – Rut/EtOH при $D=0,4 \text{ кГр}$; 3 – Rut/EtOH при $0,8 \text{ кГр}$; 4 – Rut/EtOH при $D=2,0 \text{ кГр}$

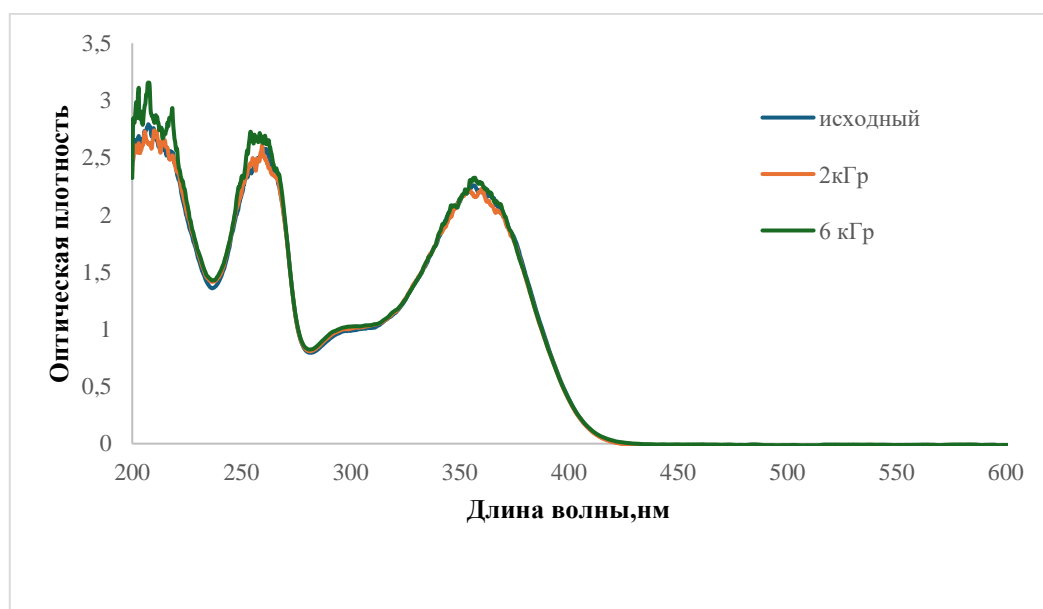


Рисунок 3.1.21 – Спектры оптического поглощения спиртового раствора рутина концентрацией $0,05 \text{ mM}$ рутина в 70%растворе этанола

На рис 3.1.21 показано, что все представленные спектры поглощения 0,05мМ рутина при разных дозах поглощения имеют максимум при длине волны 360нм. На основе закона Ламберта-Бугера-Бера можно рассчитать коэффициент экстинкции:

$$\varepsilon = A/(c.l)$$

По полученным данным можно вычислить концентрации рутина в растворах после облучения и радиационный химический выход (G).

$G_{(-RUT)} = (9.65 \cdot 10^9 \cdot [C]_{-RUT}) / (\rho \cdot D)$, где C – концентрация вещества, ρ – плотность спирта (0,789 г/см³); D – время облучения.

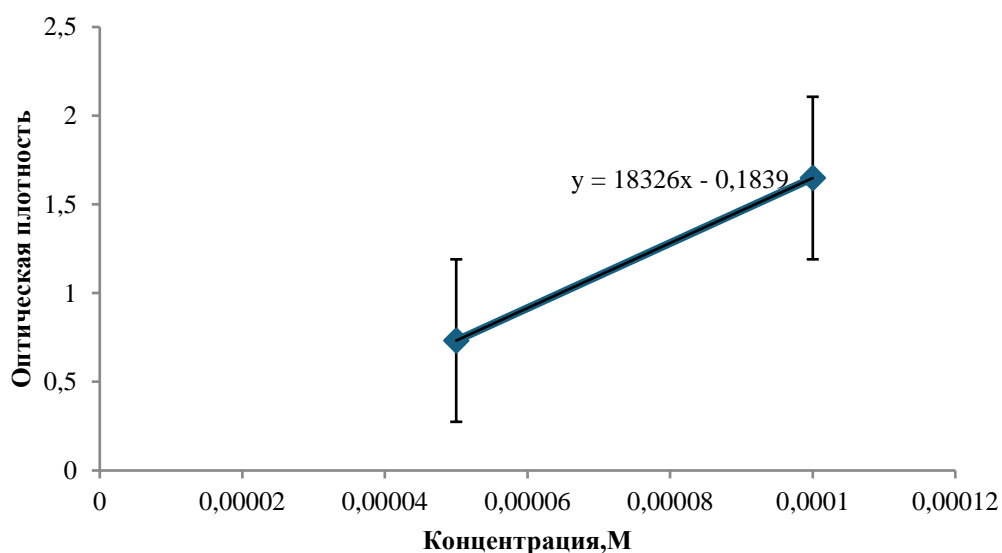


Рисунок 3.1.22 – Зависимость оптической плотности от концентрации растворов рутина

Из графика следует, что коэффициент экстинкции(ε), найденный как тангенс угла наклона прямой, равен 18326 л/моль*см. По полученным данным можно вычислить концентрации рутина в растворах после облучения и радиационный химический выход (G).

Расчёт концентраций:

$$[Rut]_{Гр} = \frac{A}{\varepsilon * l} M$$

$$[Rut]_{0Гр} = \frac{0,6781}{18326 * 1} = 3,7 * 10^{-5} M$$

$$[Rut]_{400Гр} = \frac{0,6489}{18326 * 1} = 3,54 * 10^{-5} M$$

$$[Rut]_{800Гр} = \frac{0,5480}{18326 * 1} = 2,99 * 10^{-5} M$$

$$[Rut]_{2000Гр} = \frac{0,2930}{18326 * 1} = 1,6 * 10^{-5} M$$

Расчёт радиационного химического выхода:

$$G = \frac{9,65 * 10^6 * C}{P_{обл} * \rho * \tau_{обл}}, \text{ где } C - \text{ концентрация вещества, } P_{обл} - \text{ мощность дозы; } \rho -$$

плотность спирта (0,789 г/см³); $\tau_{обл}$ – время облучения.

Данную формулу можно преобразовать в вид:

$$G = \frac{9,65 * 10^6 * C}{\rho} * tg \alpha, \text{ поскольку}$$

$$D = P * \tau \Rightarrow \frac{C}{D} = tg \alpha$$

Построим графики зависимостей концентрации рутина в спиртовых растворах от полученной дозы.

Таблица 3.1.4 – Данные по концентрациям рутина в зависимости от полученных доз (Гр)

Концентрация, М	Доза, Гр
0	0
0,0000016	400
0,0000071	800
0,000021	2000

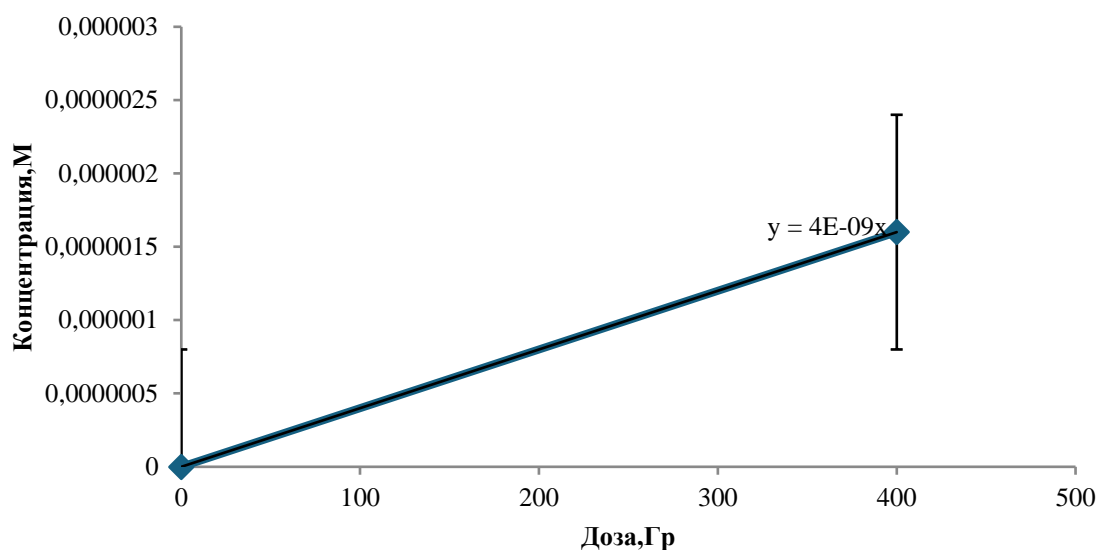


Рисунок 3.1.23 – Зависимость концентрации растворов рутина(М) от полученной дозы (Гр) в диапазоне от 0 до 400 Гр

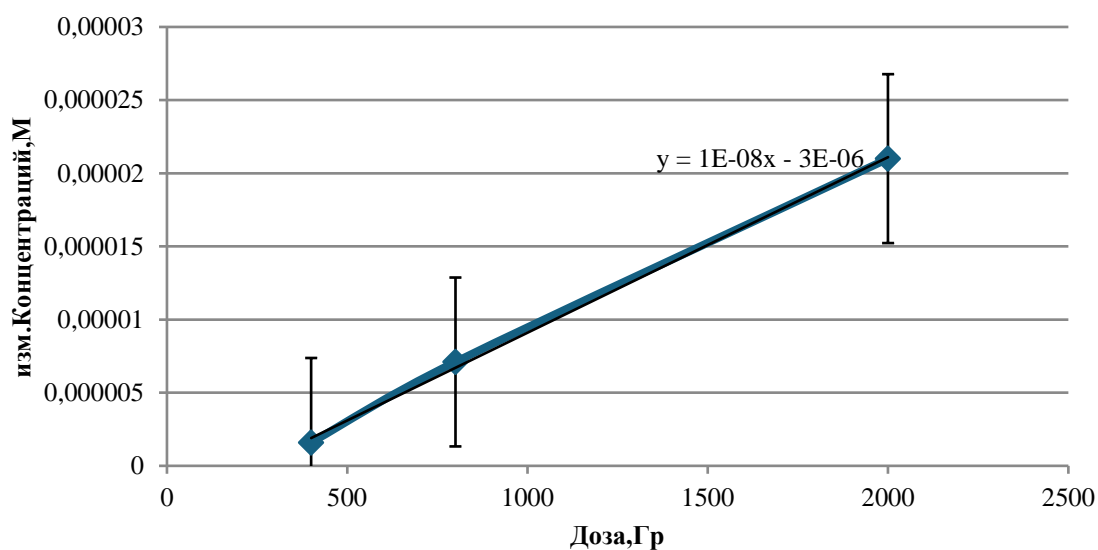


Рисунок 3.1.24 – Зависимость концентрации растворов рутина(М) от полученной дозы (Гр) в диапазоне от 400 до 2000 Гр

Для этого строим график и для каждого из двух участков 0-400Гр и 400-2000Гр строим линию тренда. Тангенс угла наклона является отношением концентрации к полученной дозе и рассчитываем по формуле радиационно-химический выход и получаем, что на участке от 0 до 400Гр он равен 0,04 молекул/100 эВ, а на участке 400-2000Гр в 2,5 раза больше.

Радиационно-химический выход спиртового раствора рутина в промежутке от 0 до 400Гр:

$$G_{0-400} = 10,316 * 10^6 * 4 * 10^{-9} = 0,041 \text{ молекул/100 эВ}$$

Радиационно-химический выход спиртового раствора рутина в промежутке от 400 до 2000 Гр:

$$G_{400-2000} = 10,316 * 10^6 * 10^{-8} = 0,103 \text{ молекул/100 эВ}$$

Таблица 3.1.5 – Полученные данные проб рутина без облучения

Номер пробирки	Объём вещества(мл)	Вещество	ОбъёмДФПГ(мл)	Оптическая плотность	Эффект ингибирования
1	2	Этанол 40%	2	0,73	-
2	2	Рутин 0,1 мМ в 40% этаноле	2	0,10	85
3	2	Рутин 0,05 мМ в 40% этаноле	2	0,14	81,05
4	2	Рутин 1 мМ в 40% этаноле	2	0,12	83,19
5	2	Этанол 96%	2	0,74	35,56

Эффект ингибирования (%) был рассчитан по формуле:

$$S.E = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100\%, \text{ где}$$

A_0 – оптическая плотность контрольного образца, A_1 – оптическая плотность исследуемого образца.

Таблица 3.1.6 – Полученные данные проб рутина после облучения

№	V _{аналит} , мл	Аналит	Доза, Гр	V(ДФПГ), мл	Оптическая плотность	Эффект ингибир ования, %
1	2	Этанол 40%	0	2	1,13	-
2	2	Рутин 0,05 мМ в 40% этаноле	0	2	0,15	86,33
3	2	Пост- эффект Рутин 0,05 мМ в 40% этаноле	400	2	0,19	83,4
4	2	Пост- эффект Рутин 0,05 мМ в 40% этаноле	800	2	0,27	75,74
5	2	Пост- эффект Рутин 0,05 мМ в 40% этаноле	2000	2	0,37	67,1

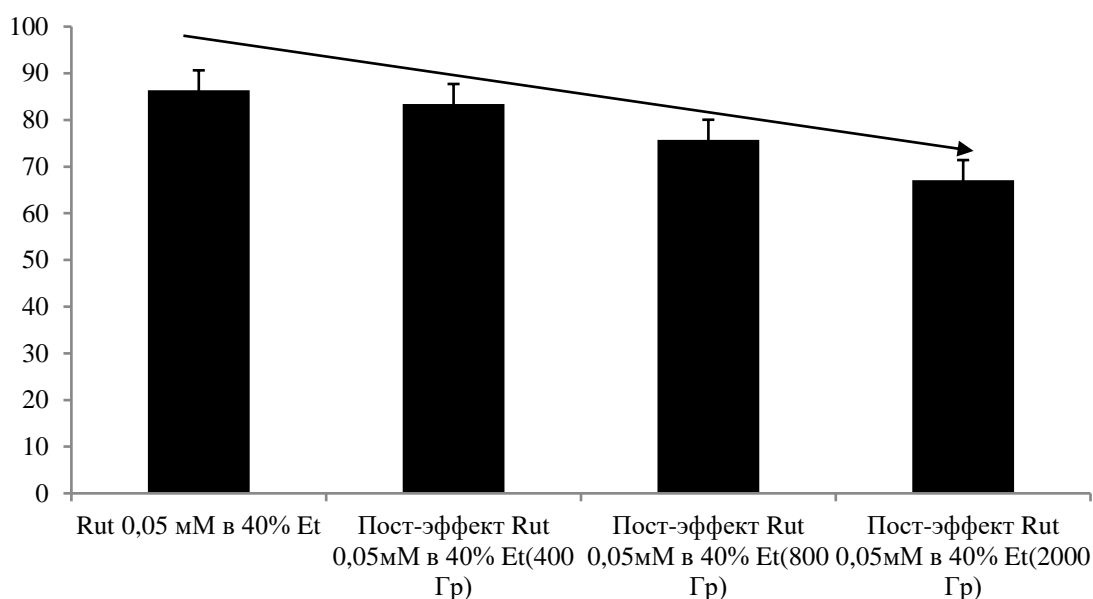


Рисунок 3.1.25– Эффект ингибирования ДФПГ рутином 0,05мМ в 40-ном этанольном растворе до и после облучения

Отмечено рис. 3.1.25, что антирадикальные свойства рутина в пост-радиационный период уменьшаются, после воздействия 2 кГр на спиртовые растворы рутина эффект ингибирования ДФПГ достигает высоких значений (больше 50%). Фенольная группа в составе рутина содержит несколько гидроксильных групп, которые обладают способностью отдавать водородные атомы свободным радикалам на примере модельного стабильного радикала ДФПГ. В результате данного процесса свободные агрессивные радикалы перестают быть активными и теряют способность наносить ущерб клеткам живых организмов. Таким образом, рутин ловит на себя свободные радикалы, защищая организм от окислительного стресса и клетки от разрушения.

Бензольное кольцо, связанное с одной или несколькими гидроксильными группами, способствует сравнительно лёгкому отрыву водорода от гидроксильной группы, за счёт смещения отрицательного заряда на кислород. В результате данного процесса наблюдается образование феноксильных радикалов, которые способны перехватывать радикалы иной природы. Особенно это полезно в реакциях с перекисью водорода.

3.1.6 Спектрофотометрическая оценка получения наночастиц серебра с использованием раствора нитрата серебра с добавлением экстрактов лекарственных растений (багульника болотного, каркаде и муррайи)

На первом этапе исследований по получению наночастиц серебра методом «Зеленого» синтеза использовались водные экстракты багульника болотного, подвергнутые разным видам воздействия, и раствор нитрата серебра [215].

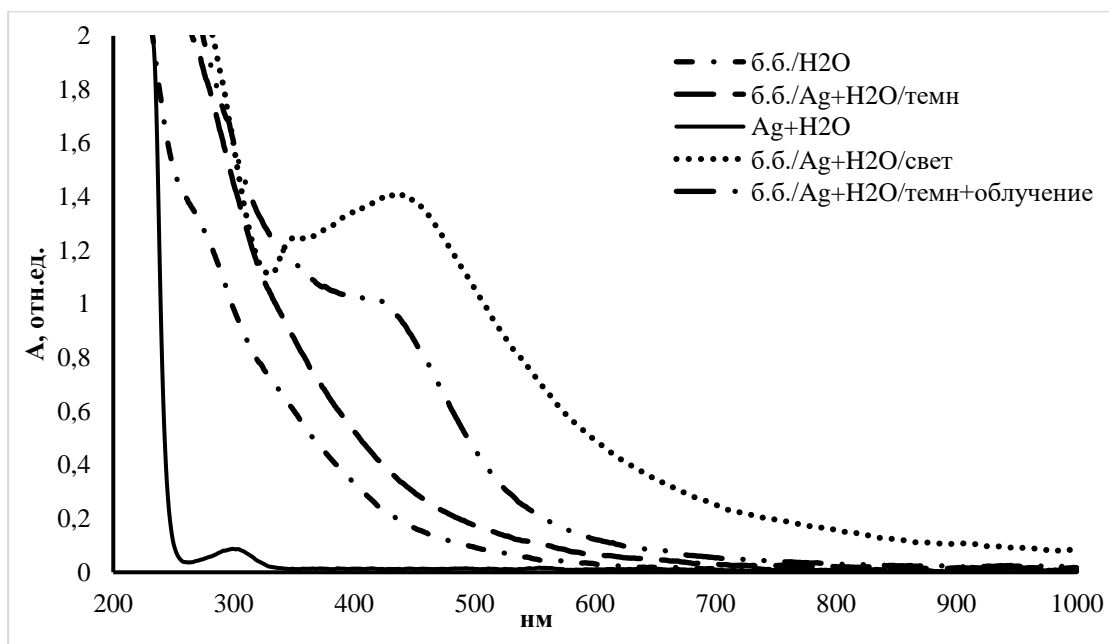


Рисунок 3.1.26 – Спектры оптического поглощения исследуемых растворов

Анализируя график изменения оптической плотности, было показано, пришли к выводу, что максимальный выход наночастиц серебра ($\lambda = 441$ нм) достигается при использовании раствора AgNO_3 10^{-3} М с добавлением экстракта багульника болотного, подвергнутого световому излучению. Эти параметры получения наночастиц серебра были использованы во всех последующих экспериментах.

Кинетику изменения оптической плотности растворов различных экстрактов в присутствии ионов серебра в зависимости от поглощенной дозы, получаемой на свету в течение 28 дней. На рисунке 3.1.28 представлена изменение спектров оптического поглощения экстракта багульник э.б.б(28 дней)/ Ag^+ .

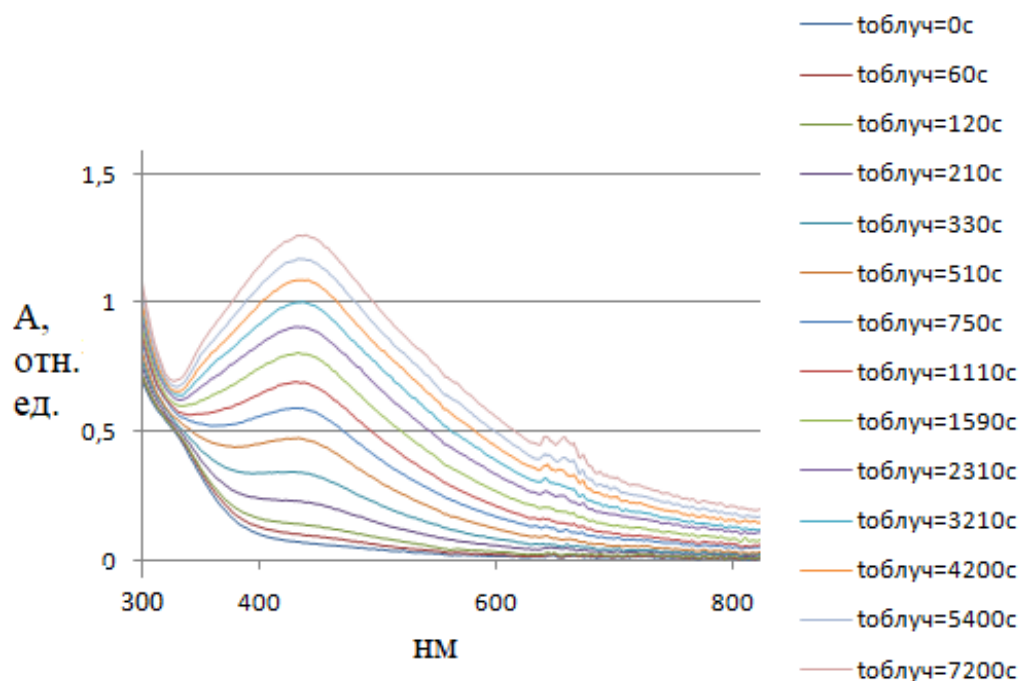


Рисунок 3.1.27– Изменение оптической плотности в зависимости от времени воздействия дневным рассеянным светом на систему 23мл раствора $\text{AgNO}_3 10^{-3}$ М с добавлением 2мл экстракта багульника болотного э.б.б(28 дней)/ Ag^+

При воздействии дневным рассеянным светом на раствор $\text{AgNO}_3 10^{-3}$ М с добавлением экстракта багульника болотного (28 дней) максимальное светопоглощение происходит при 434 нм, достигая значения $A = 1,260$ отн. ед. Данный максимум соответствует образованию наночастиц серебра, о чем также свидетельствует и постепенное изменение окраски раствора с бесцветного до желтого (Рис. 3.1.28).

При облучении раствора нитрата серебра концентрацией 10^{-3} М с добавлением экстракта багульника болотного (свежий) (Рис. 3.1.22) максимум светопоглощения наблюдается при длине волны $\lambda = 448$ нм, достигая значения $A = 1,513$ отн. ед., что подтверждает изменение окраски раствора от прозрачного (до облучения) до желтого (Рис. 3.1.29).

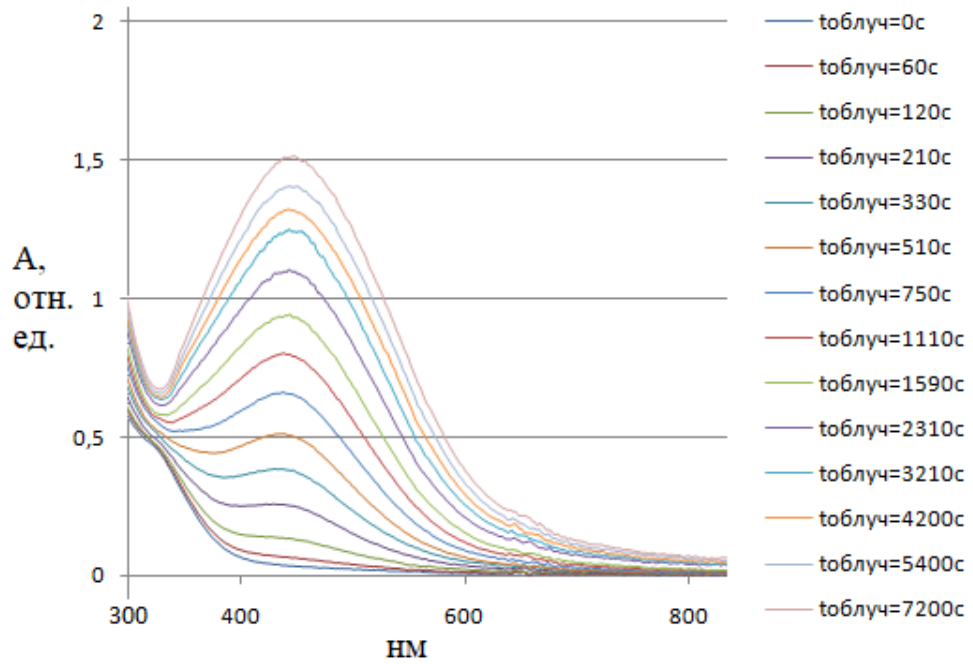


Рисунок 3.1.28 –Изменени оптической плотности в зависимости от воздействия дневным рассеянным светом на систему 23 мл раствора $\text{AgNO}_3 10^{-3}$ М с добавлением 2 мл экстракта багульника болотного (свежий)

При фотосенсибилизации на раствор нитрата серебра концентрацией 10^{-3} М с добавлением экстракта багульника болотного (9 лет) (Рис. 3.1.29), как видно на графике, полосы поглощения имеют лишь незначительные изменения с увеличением поглощенной дозы.

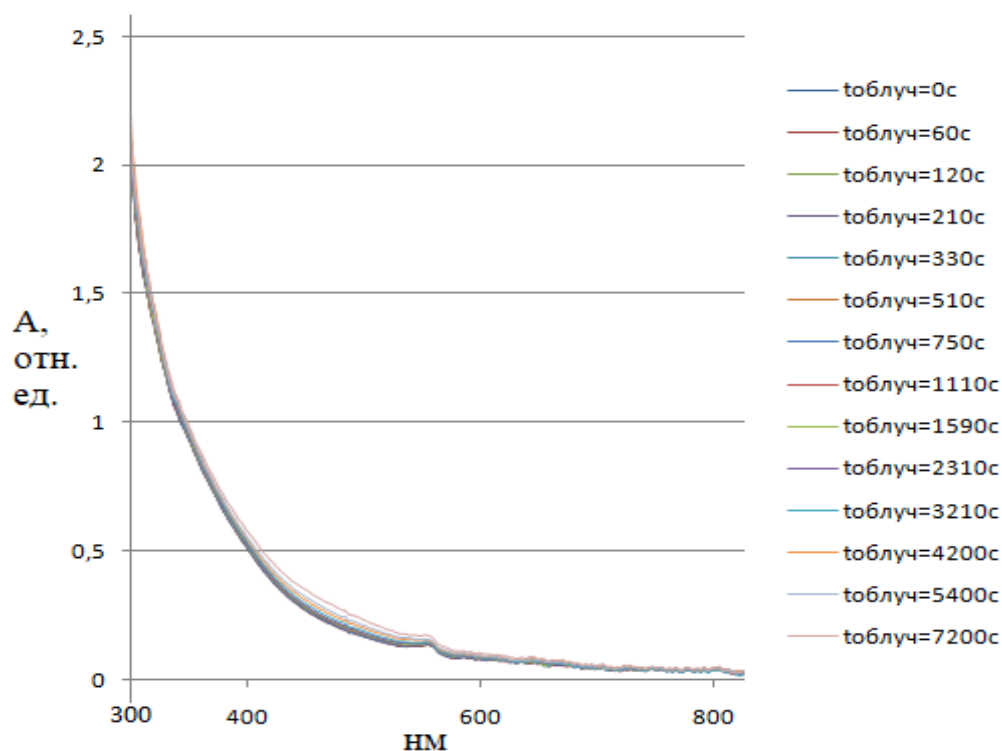


Рисунок 3.1.29 – Изменение оптической плотности в зависимости от времени воздействия дневным рассеянным светом на систему 23мл раствора AgNO_3 10^{-3} М с добавлением 2мл экстракта багульника болотного (9 лет)

Сравнив графики изменения оптической плотности багульника болотного и результаты фотографий на рисунке 3.1.30, можно предположить, что реакционная способность образования наночастиц серебра в экстракте багульника болотного обратно пропорциональна времени существования данного экстракта. В связи с этим, в дальнейших экспериментах использовались только свежеприготовленные экстракты мурайи и каркаде, которые были приготовлены непосредственно перед смешением с раствором нитрата серебра концентрацией 10^{-3} М.

Динамика изменения оптической плотности полученных смесей в зависимости от времени выдерживания приведена на рисунках 3.1.31 – 3.1.33.

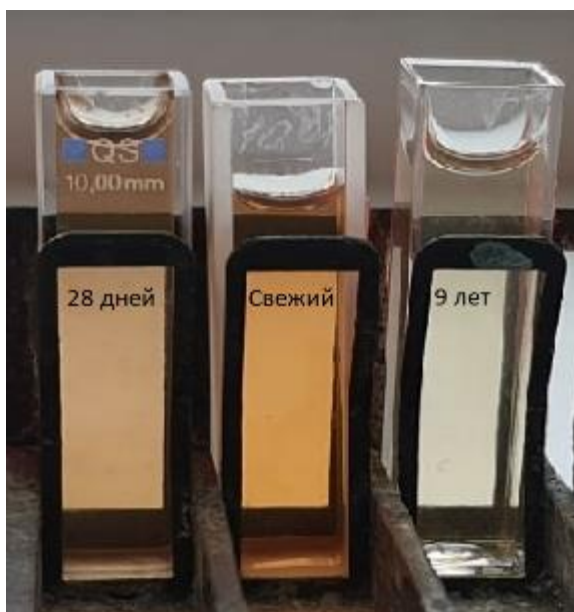


Рисунок 3.1.30 – Растворы AgNO_3 с экстрактом багульника болотного (разного времени приготовления) после 7200с воздействия

На первом этапе экспериментов было необходимо получить наночастицы из солей соответствующих металлов и неметаллов с использованием в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов водного экстракта растения багульник болотный. Для этого методом «зеленого» синтеза восстанавливали биологически активными веществами водного экстракта растения нитрата серебра (AgNO_3) и селенита натрия (Na_2SeO_3).

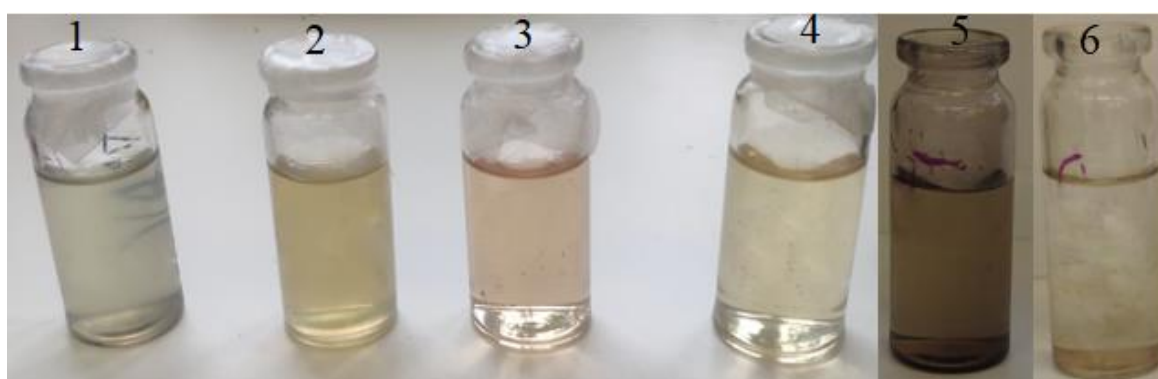


Рисунок 3.1.31 – Фото свежеприготовленных растворов солей и водного экстракта багульника болотного



Рисунок 3.1.32– Суспензии наночастиц с багульником болотным 2 сут

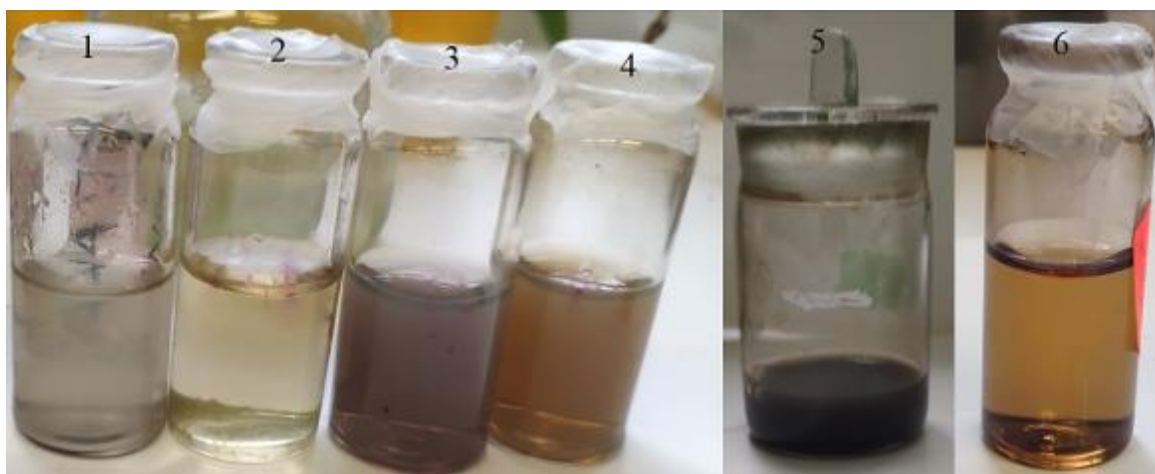


Рисунок 3.1.33 – Суспензии наночастиц с багульником болотным 6 сут

3 – э.б.б /H₂O/НЧ-Ag, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б **1:100** и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

6– э.б.б /H₂O/НЧ-Se, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 600 мкл водного экстракта э.б.б **1:10** 21.03.2023 и 7,4 мл водного раствора Na₂SeO₃ 100 мМ

Видно, что с течением времени происходит изменение окраски растворов под действием дневного рассеянного света, что связано с образованием наночастиц. Образование наночастиц в растворах вызывает изменение окраски из-за эффекта рассеяния света поскольку наночастицы имеют размеры, которые соизмеримы с длинами волн видимого света. Когда свет попадает на наночастицы, происходит рассеяние световых волн, и их интенсивность может

зависеть от размеров и формы наночастиц. Так, чем больше размеры или концентрация наночастиц, тем более темным может быть окрашен раствор.

3.1.7 Изменение спектров оптического поглощения экстракта багульника болотного в присутствии и в отсутствие ионов серебра и селена

В данном разделе приведены результаты экспериментов по изучению спектров оптического поглощения экстрактов багульника болотного (э.б.б.) без добавления ионов серебра и с добавлением ионов серебра и образованием наночастиц серебра. Спектры были сняты с интервалами измерения по времени: измерения 1-11 – 1 мин; 12-20 – 2 мин; 21-34 – 3 мин; 41-43 – 5 мин .

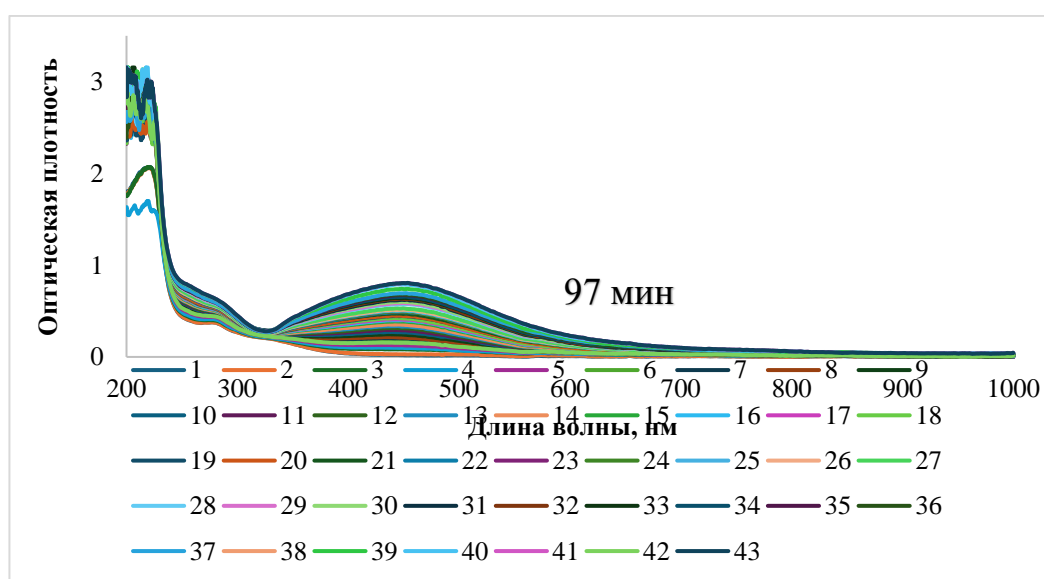


Рисунок 3.1.34 – Смеси э.б.б /H₂O/НЧ-Ag, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б **1:100** и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

На рисунке 3.1.34. представлены спектры поглощения с интервалами по времени: спектры 1–9 – 1 мин, спектры 10–29 – 2 мин, спектры 30–40 – 3 мин, спектры 41–43 – 5 мин. Как видно из рисунка формирование плазмонной полосы поглощения серебра начинается после 3 минут облучения. Это связано с индукционным периодом, который характеризует стартовые изменения в

системе, спектрально не идентифицируется и соответствует процессам восстановления Ag^+ до Ag^0 с образованием центров кристаллизации металлической фазы. Время формирования устойчивых зародышей зависит от множества факторов, таких как природа реагентов, температура синтеза и pH реакционной среды. Второй период (кривые 3–43) характеризуется появлением и усилением интенсивности плазмонного поглощения и соответствует процессам образовавшихся на первом этапе частиц вследствие восстановления серебра на поверхности растущей наночастицы, а также дальнейшей стабилизации. Было выявлено постепенное замедление образования наночастиц, связанное с тем, что реакция начинает лимитироваться диффузией.

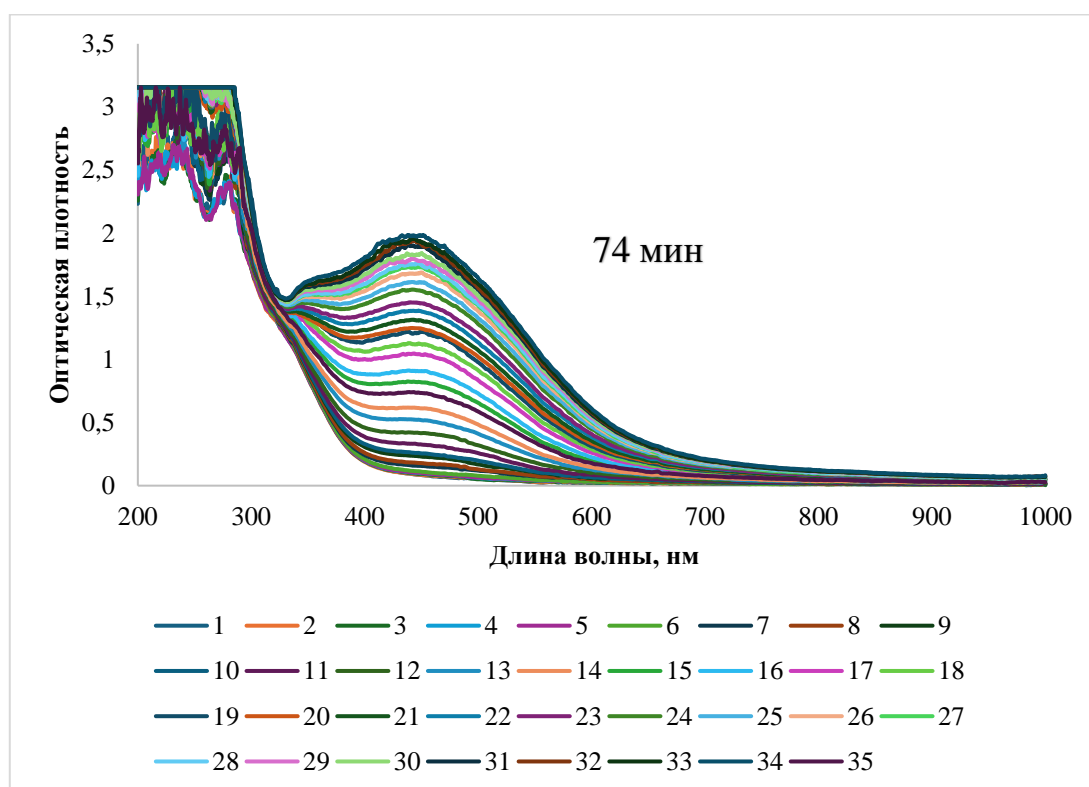


Рисунок 3.1.35 – Спектр суспензии э.б.б / H_2O /НЧ- Ag , полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б **1:10** и 47,5 мл водного раствора AgNO_3 1 мМ

На рис. 3.1.35 представлены спектры поглощения с интервалами по времени: измерения 1-11 – 1 мин, 12-20 – 2 мин, 21-34 – 3 мин. Первый индукционный период (кривые 1-5) характеризует стартовые изменения в

системе и сопровождается преимущественно протеканием начальных стадий химического восстановления серебра, в результате которого происходит зарождение центров формирования наночастиц в растворе. На втором этапе (кривые б–35), одновременно с продолжением зарождения центров формирования наночастиц в реакционной зоне, развивается процесс роста частиц, образовавшихся на первом этапе, а также их стабилизация за счет сорбции макромолекул флавоноидов на поверхности металла. Полоса плазмонного резонанса образуется через 5 мин, максимум полосы поглощения составляет 450 нм. С течением времени сдвига максимума полосы поглощения не происходит, что доказывает стабильность получаемых наночастиц.

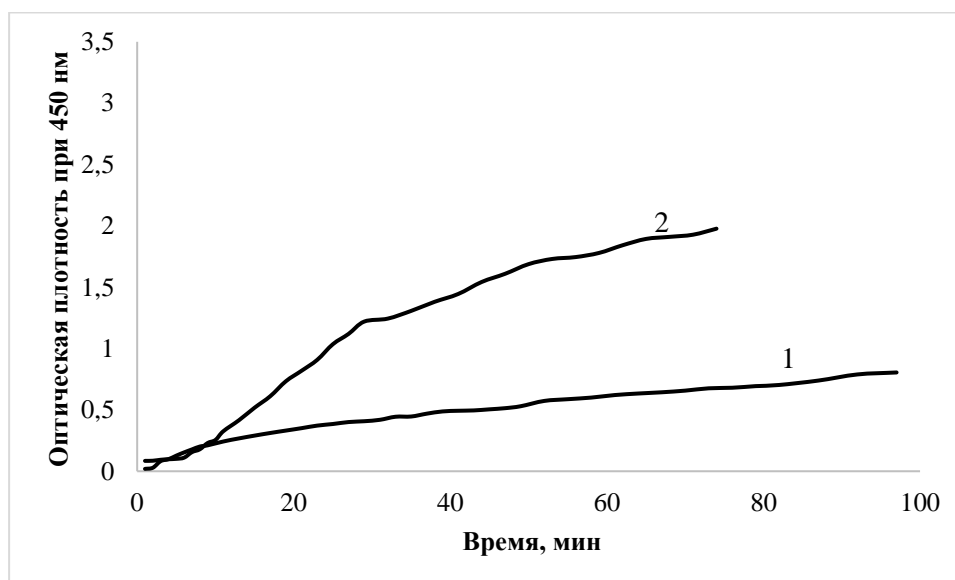


Рисунок 3.1.36 – Сравнение оптической плотности суспензий с наночастицами серебра от времени

1 – э.б.б/Н₂О/НЧ-Ag, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б **1:100** и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

2 – э.б.б/Н₂О/НЧ-Ag, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б. **1:10** и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

При сравнении оптической плотности растворов с разной концентрацией багульника болотного видно, что интенсивность полосы поглощения у образца с

большей концентрацией выше. Это объясняется наличием большего количества флавоноидов, восстанавливающих ионы серебра, во втором образце, имеющем большую концентрацию наночастиц. При этом в первые минуты значение оптической плотности совпадает, что связано с зарождением центров формирования наночастиц в растворе.

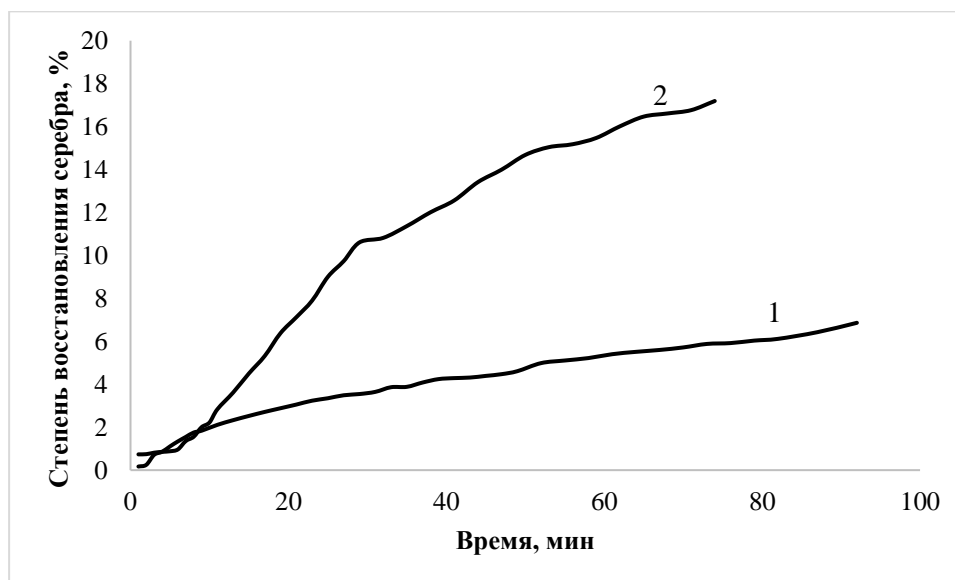


Рисунок 3.1.37– Степень восстановления серебра в суспензиях с разной концентрацией э.б.б

1 – э.б.б/Н₂О/НЧ-Ag, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б **1:100** и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

2 – э.б.б/Н₂О/НЧ-Ag, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта э.б.б **1:10** и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

Также отмечено, что с повышением концентрации экстракта э.б.б повышается степень восстановления наночастиц серебра. На 74 минуте в водном экстракте 1:100 степень восстановления составляет 5,9%, тогда как при концентрации экстракта 10 раз больше (разбавление 1:10) – 17,2%, что в 2,8 раз больше.

Согласно проведенным исследованиям, для дальнейших исследований с экстрактами муррайи метельчатой и каркаде, использовались свежие экстракты

данных растений, которые, после добавления раствора нитрата серебра, были подвержены солнечному излучению.

При облучении раствора нитрата серебра концентрацией 10^{-3} М с добавлением экстракта муррай метельчатой (свежий) (Рис.3.1.40) максимум светопоглощения наблюдается при длине волны $\lambda = 443$ нм, в данной точке достигается значени $A = 0,5735$ отн. ед., что подтверждает изменение окраски раствора от прозрачного (до воздействия светом) до желтого.

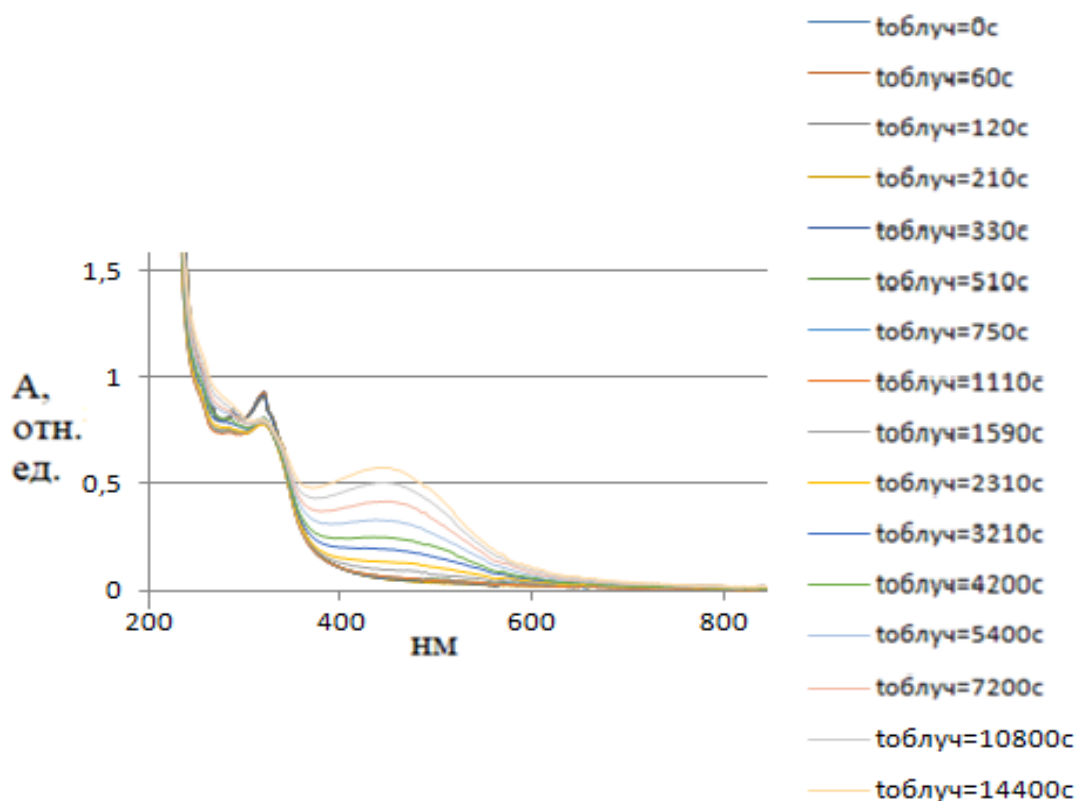


Рисунок 3.1.38 –Изменения оптической плотности суспензий 23мл раствора AgNO_3 10^{-3} М с добавлением 2мл экстракта муррай метельчатой в зависимости от воздействия дневным рассеянным светом

Согласно графику (рисунок 3.1.38), был сделан вывод, что реакционная способность муррай метельчатой к образованию наночастиц серебра меньше в 2,6 раза, чем у багульника болотного.

Также нами была проведена оценка возможности дальнейшего образования наночастиц серебра и было проведено снятие оптической плотности раствора спустя 6 дней (Рис. 3.1.39), что подтверждает изменение окраски

раствора от прозрачного (до воздействия дневным рассеяным светом) до темно-желтого (Рис. 3.1.40). Исследование проводилось при использовании 1мм кварцевой кюветы, т.к. при использовании стандартной 10мм кварцевой кюветы не было возможности вывести все данные корректно.

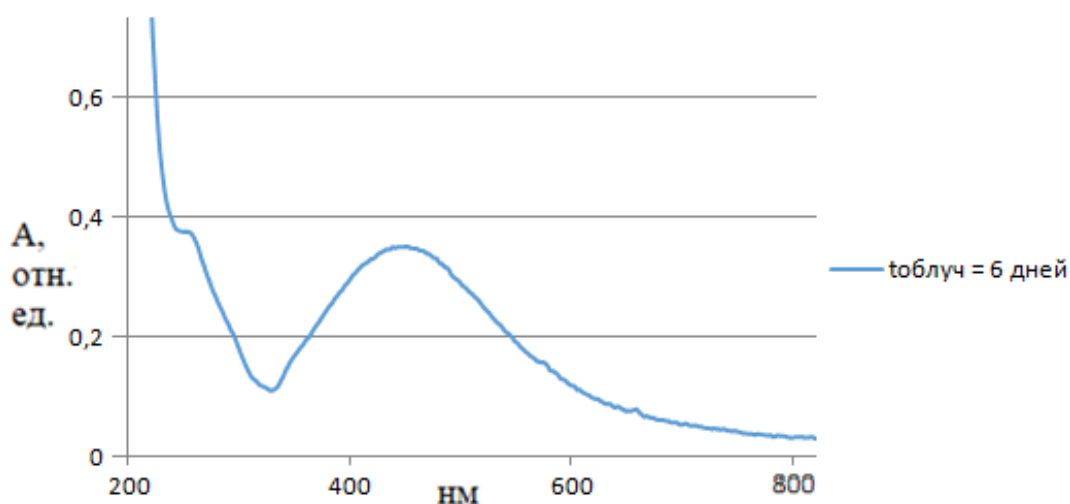


Рисунок 3.1.39 –Изменения оптической плотности суспензии 23мл раствора AgNO_3 10^{-3} М с добавлением 2мл экстракта муррайи метельчатой в зависимости от воздействия дневным светом (6 суток)

Показано, что максимум светопоглощения наблюдается при длине волны $\lambda = 450$ нм. В данной точке достигается значени $A = 0,3494$ отн. ед., что соответствует значению $A = 3,494$ согласно закону Ламберта-Бугера-Бера, если бы была использована стандартная кварцевая кювета толщиной 10мм.



Рисунок 3.1.40 – Раствор AgNO_3 с экстрактом муррайи после 6 суток дневного рассеянного света

Далее было проведено исследование с использованием экстракта каркаде (Рис. 3.1.41). Максимум светопоглощения наблюдается при длине волны $\lambda = 463$ нм. В данной точке достигается значени $A = 0,6797$ отн. ед.

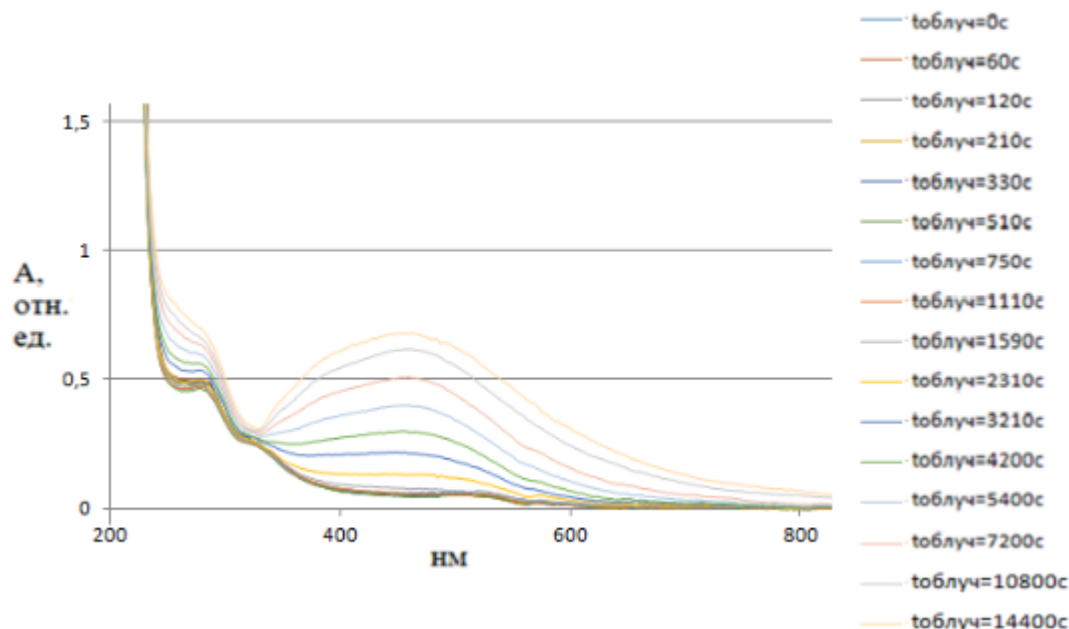


Рисунок 3.1.41 – Изменение оптической плотности суспензии 23мл раствора AgNO_3 10^{-3} М с добавлением 2мл экстракта каркаде в зависимости от времени воздействия дневным рассеянным светом

Как и с муррайей метельчатой, было проведено исследование при длительности облучения равном 6 суткам. Максимум светопоглощения наблюдается при длине волны $\lambda = 432$ нм. В данной точке достигается значени $A = 1,5209$ отн. ед. При этом на графике заметны существенные колебания, вероятно, это связано с тем, что спустя 6 дней в растворе выпал осадок частиц серебра (Рис. 3.1.42) и для его анализа использовалась ультразвуковая ванна с перемешиванием для придания раствору однородности (Рис. 3.1.43).



Рисунок 3.1.42 – Раствор AgNO_3 с экстрактом каркаде после 6 суток облучения и перемешивания в ультразвуковой ванне



Рисунок 3.1.43 – Раствор AgNO_3 с каркаде

3.1.8 Определение размера и дзета-потенциала наночастиц

Таблица 3.1.7 – Размер наночастиц гранулометр ANALYSETTE 12 DynaSizer

№ образца	Средний размер частиц, нм
1	74
2	112
3	162

1 – э.б.б/ H_2O / HCl -Ag полученный под действием рентгеновского облучения 20 мин, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора AgNO_3 1 мМ

2 – э.б.б/ H_2O / HCl -Ag полученный в отсутствии воздействия дневного рассеянного видимого света при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора AgNO_3 1 мМ

3 – э.б.б/Н₂О/НЧ-Аg полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

Видно, что при воздействии рентгеновского облучения средний размер наночастиц равен 74 нм, это меньше, чем под действием дневного рассеянного видимого света. Это может связано с тем, что рентгеновское излучение обладает более высокой энергией, которая может вызывать физические и химические изменения в материале, приводящие к формированию более мелких частиц. Также если после приготовления раствора препятствовать попаданию света, в связи с замедлением реакции и препятствию коагуляции, то формируются частицы меньшего размера.

Таблица 3.1.8 – Размер наночастиц Malvern zetasizer

№ образца	Размер частиц, Нм	Количество, %
1	77,9	17,3
	15,9	82,7
2	129,4	31,6
	25,8	68,4
3	88,7	0,2
	3,33	98,6
	14,3	1,2

1– э.б.б/Н₂О/НЧ-Аg полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

2 – э.б.б/Н₂О/НЧ-Аg полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора AgNO₃ 1 мМ

3 – э.б.б/ H_2O / HCl -Ag полученный под действием рентгеновского облучения 20 мин, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора $AgNO_3$ 1 мМ

Полученные наночастицы экстрактом синтезированного оказались меньшего размера. Это связано с разным содержанием флавоноидов восстанавливающих ионы серебра. Также наночастицы, полученные под действием рентгеновского облучения, имеют меньший диаметр.

Таблица 3.1.9 – Дзетта Потенциал наночастиц Malvern zetasizer

№ образца	Дзетта потенциал, мВ
1	-14,5
2	
3	-15,1

1 – э.б.б/ H_2O / HCl -Ag полученный под действием облучения 20 мин ч/з, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора $AgNO_3$ 1 мМ

2 – э.б.б/ H_2O / HCl -Ag полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 2,5 мл водного экстракта б.б. 1:100 и 47,5 мл водного раствора $AgNO_3$ 1 мМ 3

3 – э.б.б/ H_2O / HCl -Se полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 6 мл водного экстракта б.б. 1г/10мл и 2 мл водного раствора Na_2SeO_3 100 мМ

Частицы с дзета-потенциалом выше 30 мВ, как правило, считаются стабильными, чем больше электрокинетический потенциал, тем устойчивее коллоид. Дзетта потенциал полученных наночастиц меньше 30 мВ, что говорит о возможной коагуляции частиц. Однако следует отметить, что значение дзета-потенциала не является достаточным показателем стабильности наночастиц. Другие факторы, такие как размер и форма частиц, концентрация ионов в растворе, также оказывают влияние на их стабильность.

Наночастицы селена в системе э.б.б/НЧ-Se были синтезированы с использованием метода “зеленого” синтеза путем смешивания экстракта багульника болотного с раствором селенита натрия при видимом освещении в течение 24 часов. Изменение цвета с бледно-желтого на ярко-красный указывало на образование наночастиц. Спектральный анализ показал увеличение пика, что подтверждает взаимодействие между экстрактом и наночастицами селена. Дифференциальный спектр (Рис.3.1.44, кривая 3) с максимумом при 400 нм и полосой в области 470–600 нм дополнительно подтвердил образование наночастиц селена и их взаимодействие с биологически активными компонентами багульника болотного.

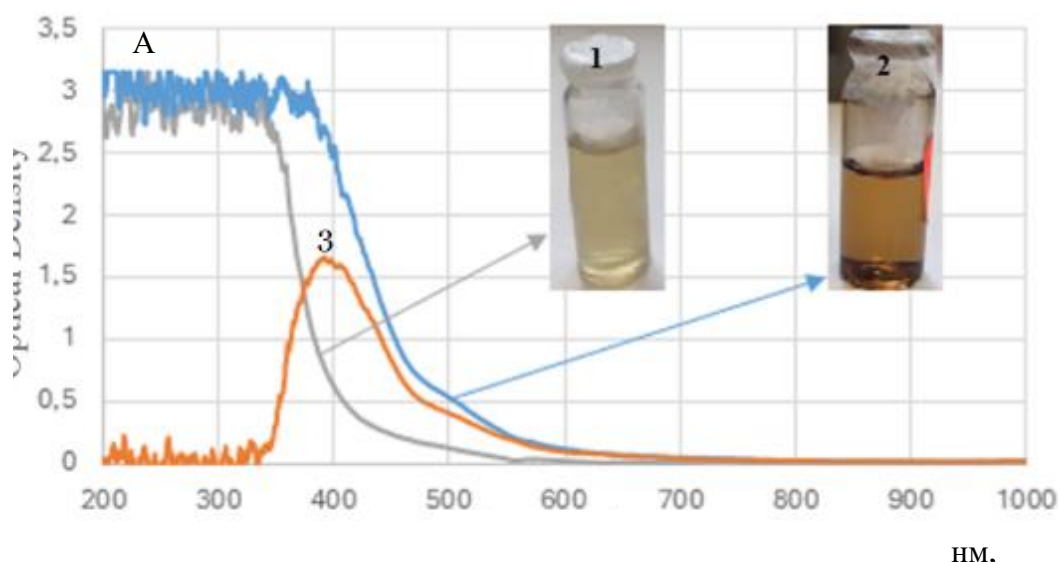


Рисунок 3.1.44 – Спектры поглощения в ультрафиолетовом и видимом диапазонах системы э.б.б/НЧ-Se: 1 – водный экстракт *L. palustre* (1:100), 2 – Система э.б.б/НЧ-Se, 3 – спектральная разница между кривыми 2 и 1.

Растворы э.б.б/НЧ-Se оставались стабильными в течение длительного периода времени, а измерения размера частиц проводились через два месяца с использованием СЭМ. Перед анализом растворы э.б.б/НЧ-Se наносили на ядерные фильтры с размером микропор 0,2 мкм. СЭМ-изображения подтвердили наличие наночастиц со средним размером 50 нм, что указывает на их наноразмерную природу и равномерное распределение (рис. 3.1.45). Этот результат подтверждает эффективность “зеленого” подхода к синтезу, использованного в данном исследовании.

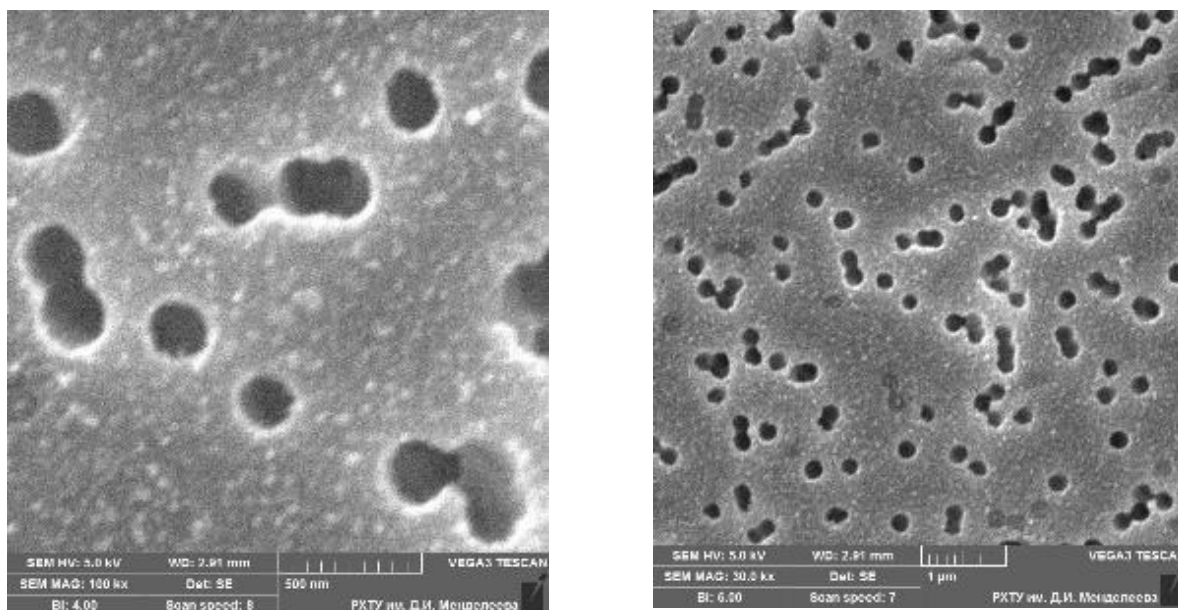


Рисунок 3.1.45– СЭМ-изображение наночастиц э.б.б/НЧ-Se при увеличении в 100кх и 30кх

3.2 Исследование спектров флуоресценции экстрактов донника и багульника

Ниже представлены спектры флуоресценции водного раствора кумарина $c = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л до и после воздействия ионизирующего излучения.

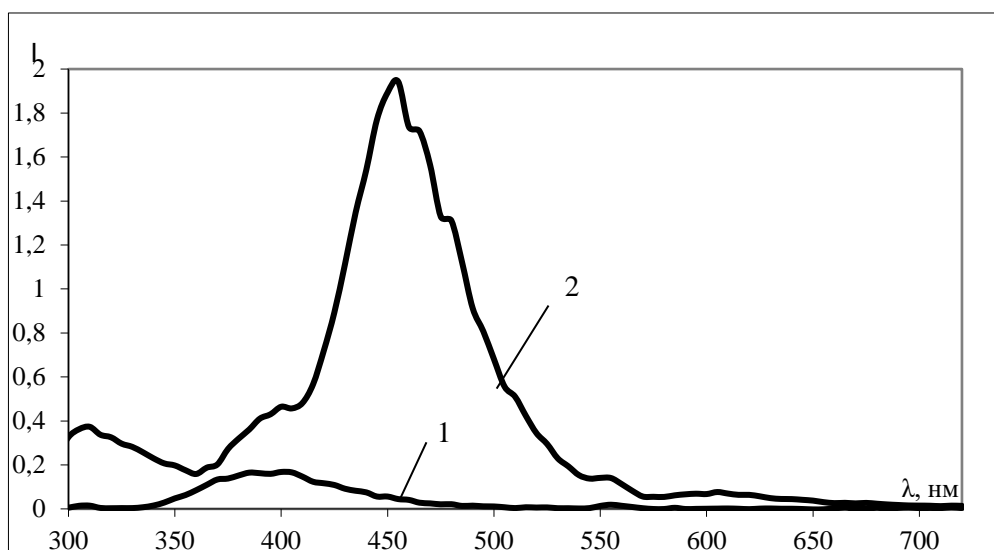


Рисунок 3.2.1 – Спектры флуоресценции водного раствора кумарина $c = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л: 1 - исходный раствор, 2 - после облучения $D = 0.36$ кГр. Возбуждение 280 нм

При облучении водного раствора синтетического кумарина с концентрацией $c = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л зарегистрирована полоса с максимумом флуоресценции при 455 нм. В результате радиационно-химических превращений образуется флуоресцирующее гидроксипроизводное кумарина. Об образовании гидроксипроизводной свидетельствуют данные по импульсному радиолизу [193]. Кривые флуоресценции донника лекарственного и кумарина аналогичны. Интенсивная полоса флуоресценции у донника объясняется присутствием в составе экстрактов биологически активных веществ. На рис. 3.2.2 представлены спектры флуоресценции при длине возбуждения 330 нм, которая принадлежит кумаринам и его производным.

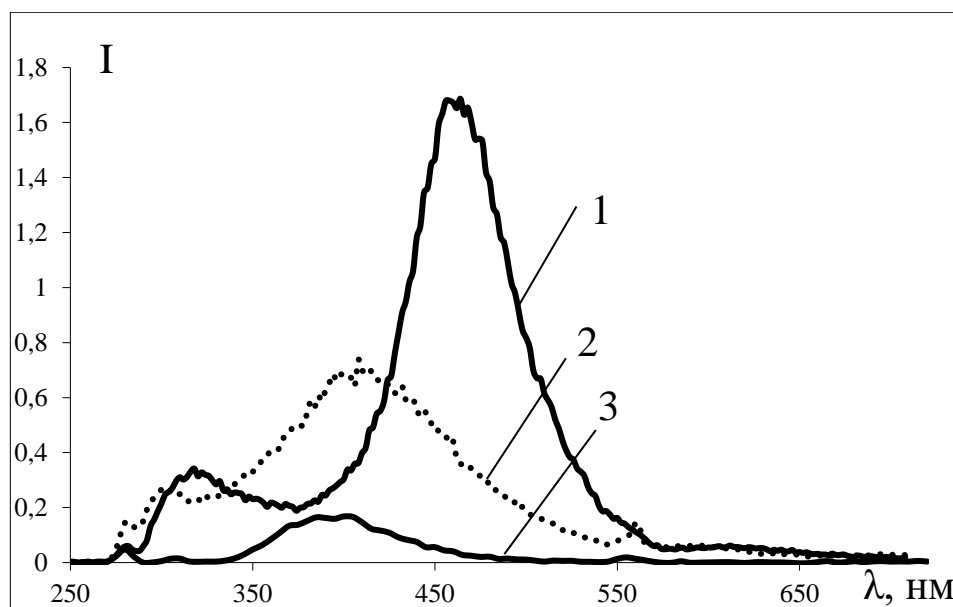


Рисунок 3.2.2 – Флуоресцентные кривые при возбуждении 280 нм, $c = 2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл 1 - багульник болотный, 2 - донник лекарственный, 3 – кумарин

Зарегистрировано, что максимумы флуоресценции различны: в доннике 434–440 нм, в багульнике 458–464 нм.

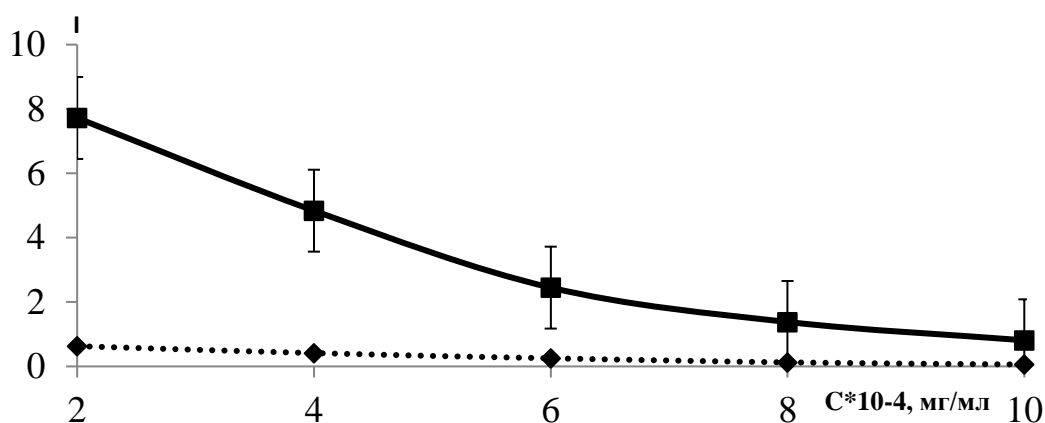


Рисунок 3.2.3 – Изменение интенсивности экстрактов багульника болотного при регистрации $\lambda_{\max} = 464$ нм и донника лекарственного при регистрации $\lambda_{\max} = 430$ нм в зависимости от изменения концентрации. Возбуждение 280 нм

Опираясь на справочные данные флуоресценция у кумарина не обнаруживается [194], это свидетельствует, что в доннике лекарственном содержится кумарин.

3.3 Хроматографическое исследование кумаринов и экстрактов донника, багульника и муррайи

3.3.1 Газо-жидкостная хроматография экстракта донника

Методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) исследован экстракт донника лекарственного, подготовленный к анализу по методике. Проанализировали суммарное содержание активных веществ в сырье.

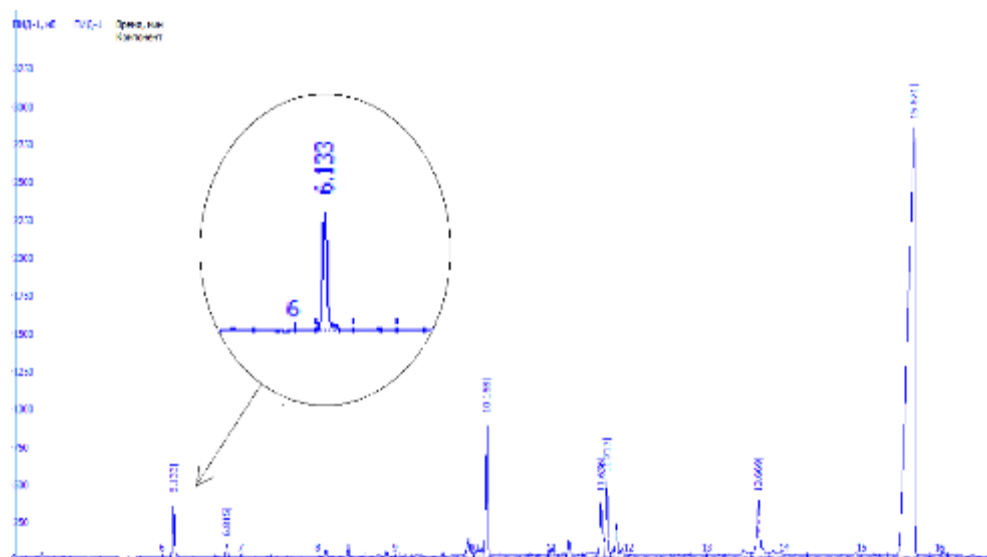


Рисунок 3.3.1 – Хроматограмма спиртового извлечения травы донника лекарственного

Для подтверждения присутствия кумарина в доннике лекарственном использовали метку раствора кумарина в CH_2Cl_2 . На основании данных сравнительного анализа времени удерживания пиков вещества на хроматограмме анализируемого и стандартного образца подтверждено содержание кумарина, его время удерживания 6,133 мин.

Концентрация кумарина в экстракте донника лекарственного по полученным данным равна $1.4 \cdot 10^{-4}$ моль/л на 5 г сухого порошка, растворённого в 100 мл этанола.

После воздействия на систему ионизирующего излучения повторно проанализировали состав активных веществ методом ГЖХ. Сравнение экспериментальных данных, представленных на рис. 3.3.2, наглядно указывает какие вещества подверглись разложению после облучения системы $D = 6,7$ кГр.

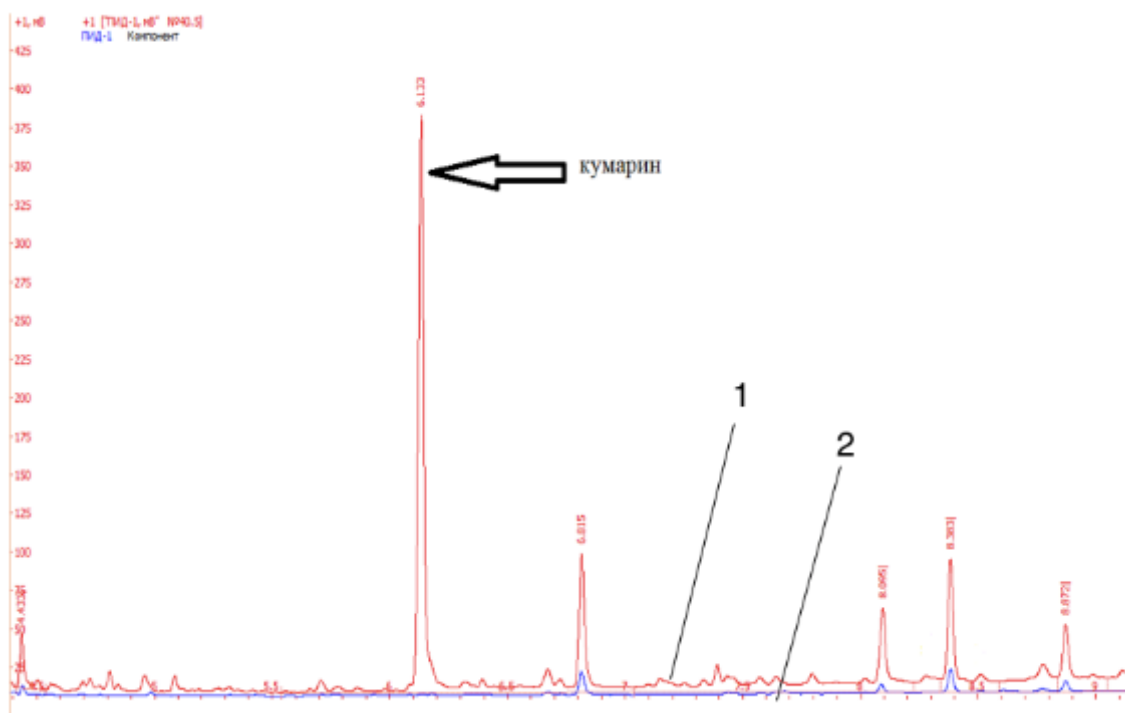


Рисунок 3.3.2 – Хроматограмма облученного $D = 6,7$ кГр спиртового извлечения донника лекарственного (синим цветом) – кривая 2 и необлученного спиртового извлечения травы донника лекарственного (красным цветом) - кривая 1 в деаэрированных условиях

Несмотря на убыль экстрактивных веществ, основной продукт, который подвергся полному разложению в результате воздействия ионизирующего излучения, является кумарин. Таким образом показано, что за протекторную активность, выявленную у экстрактов донника лекарственного, отвечает кумарин. Концентрация кумарина в суммарном пересчете составляет 2% от общей концентрации остальных веществ.

3.3.2 Определение концентрации кумарина в водно-этанольных экстрактах донника после воздействия ионизирующего излучения

Показано, что кумарин проявляет антирадикальные свойства, но эти свойства зависят от его концентрации в экстрактах донника лекарственного при

использовании различных растворителей, чтобы результаты не изменялись в зависимости от условий хроматографирования в работе использовали внутренний стандарт [187]. В качестве внутреннего стандарта был взят нафталин, для которого имеется четкое различие во временах удерживания раствора в хроматографической колонке, что представлено на рис. 3.3.3.

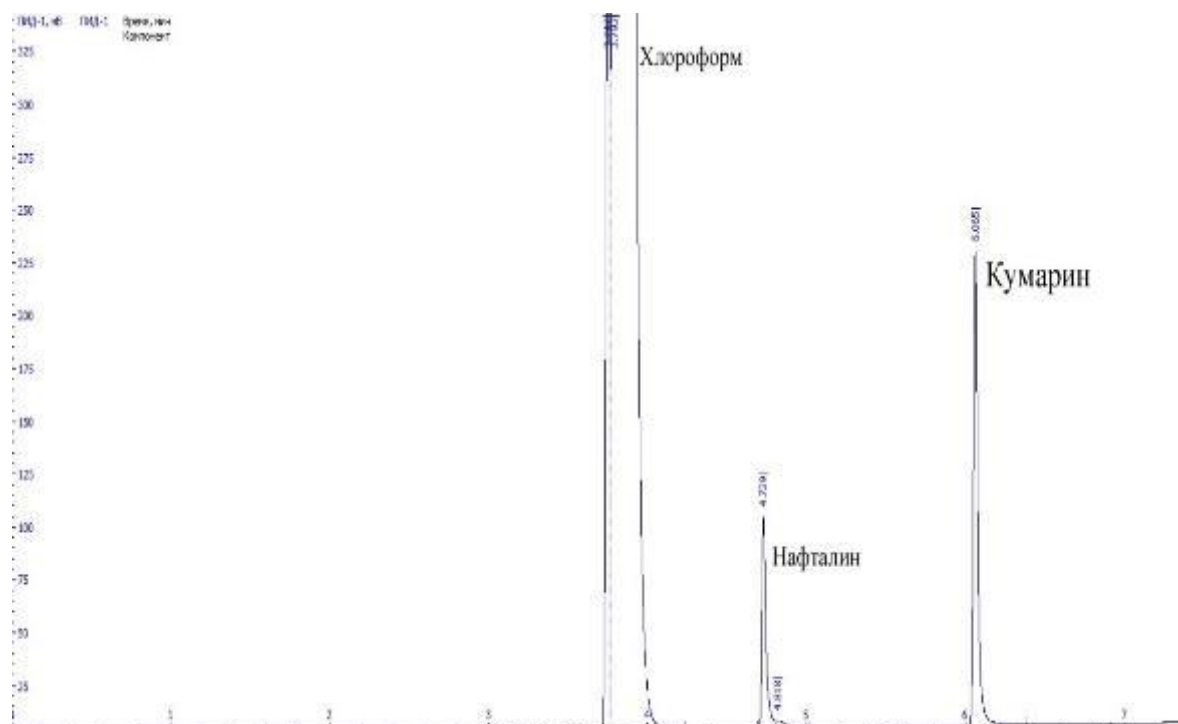


Рисунок 3.3.3 – Хроматограмма раствора кумарина в нафталине с хлороформом

Зависимость концентрации кумарина от соотношения площадей хроматографических пиков кумарина и стандарта-нафталина $\frac{S_{coum.}}{S_{cm.}}$ была построена (рис. 3.3.4).

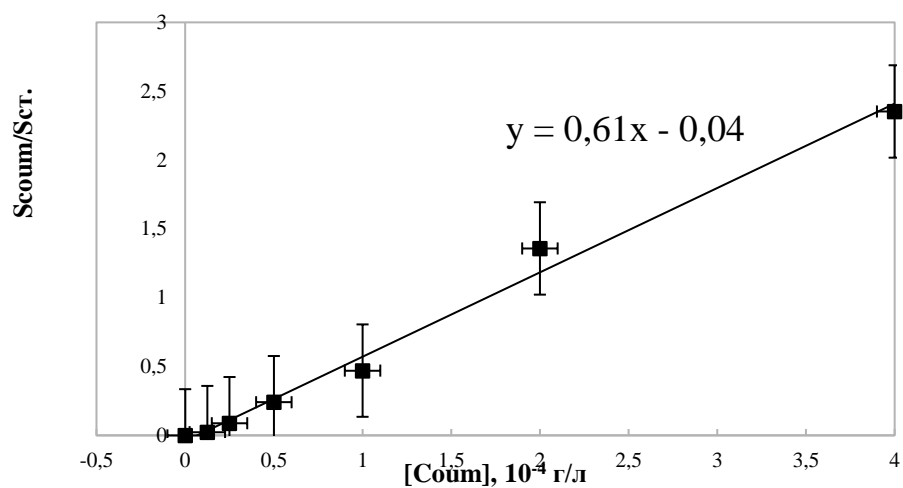


Рисунок 3.3.4 – Зависимость соотношения площадей хроматографических пиков $\frac{S_{coum.}}{S_{cr.}}$ от концентрации кумарина

Аналогично построена калибровочная прямая зависимости концентрации дигидрокумарина от соотношения площадей хроматографических пиков $\frac{S_{dihydroCoum.}}{S_{cr.}}$ (рис. 3.3.5).

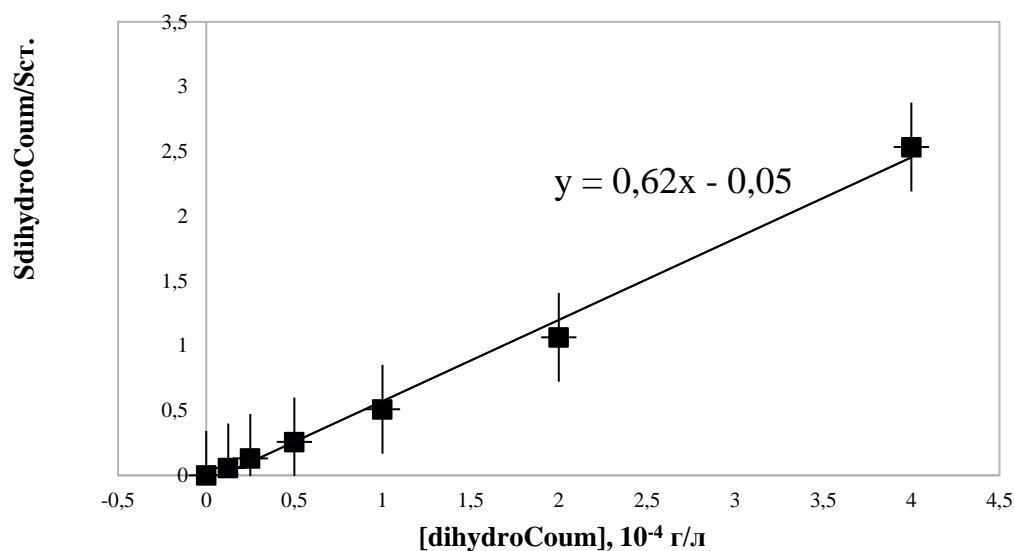


Рисунок 3.3.5 – Зависимость соотношения площадей хроматографических пиков $\frac{S_{dihydroCoum}}{S_{cr.}}$ от концентрации дигидрокумарина

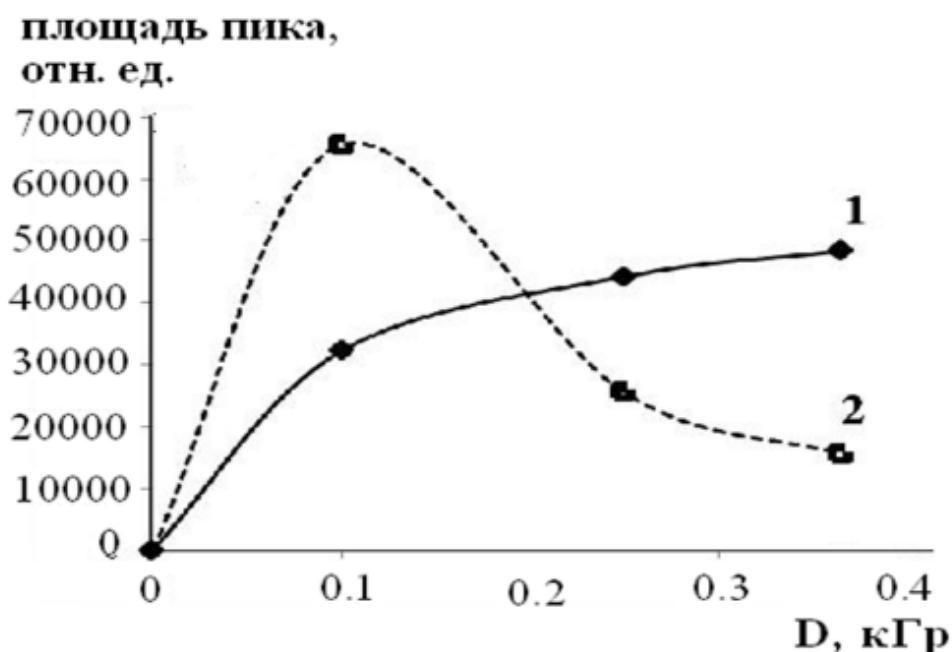


Рисунок 3.3.6 – Характер изменения концентрации продуктов стационарного радиолита кумарина в зависимости от дозы облучения

Показано, что концентрация продуктов радиационно-химического превращения кумарина с временем удерживания 2,62 мин в зависимости от дозы имеет экстремальную зависимость, что свидетельствует о его дальнейшем превращении по двойной связи C(3) = C(4). Продукт с временем удерживания 3,58 мин с ростом дозы накапливается в системе, следовательно, производное дигидрокумарина не реакционноспособное и в дальнейших превращениях не принимает участия (рисунок 3.3.7).

Были сняты хроматограммы экстрактов донника с различным содержанием этанола. С учетом калибровочного графика с нафталином была получена зависимость концентрации кумарина от процентного содержания этилового спирта в системе (рис. 3.3.7).

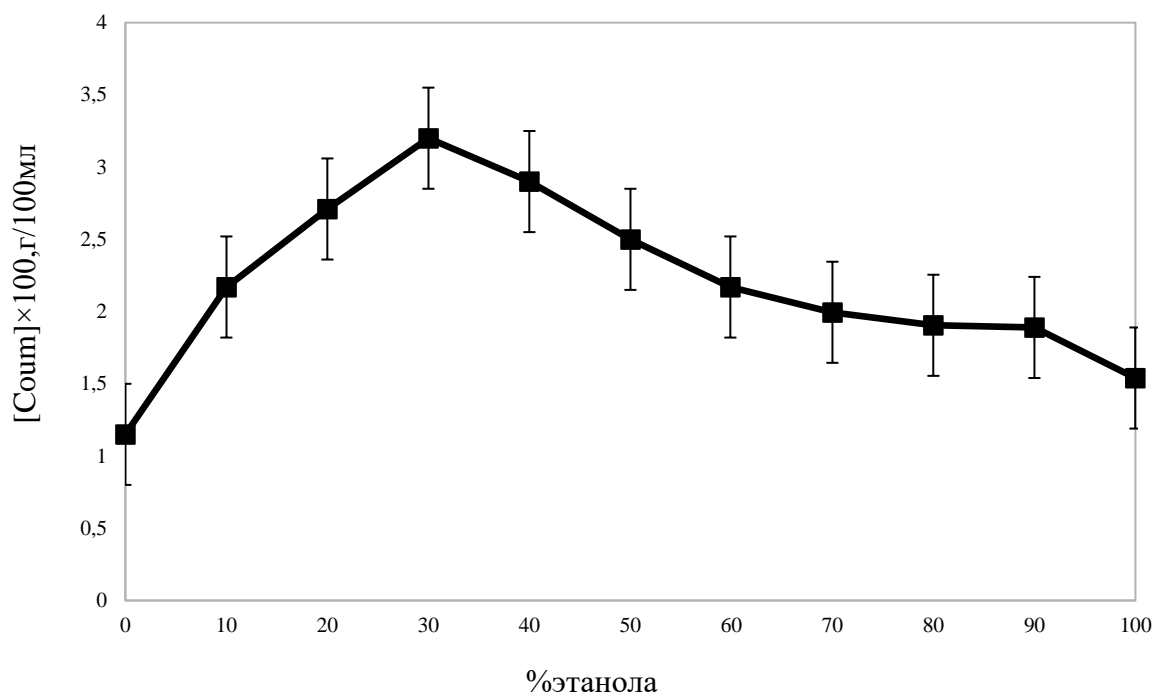


Рисунок 3.3.7 – Зависимость концентрации кумарина от процентного содержания этилового спирта в экстракте донника лекарственного

Полученный график показывает (рис. 3.3.7), что максимальная концентрация кумарина содержится в 30%–40 % -ных спиртовых растворах донника.

Установлено, что использование в качестве экстрагента этилового спирта в концентрациях от 20% до 70% позволяет достигать максимального содержания кумарина в извлечениях.

Аналогично был построен график содержания дигидрокумарина в доннике (рис. 3.3.8).

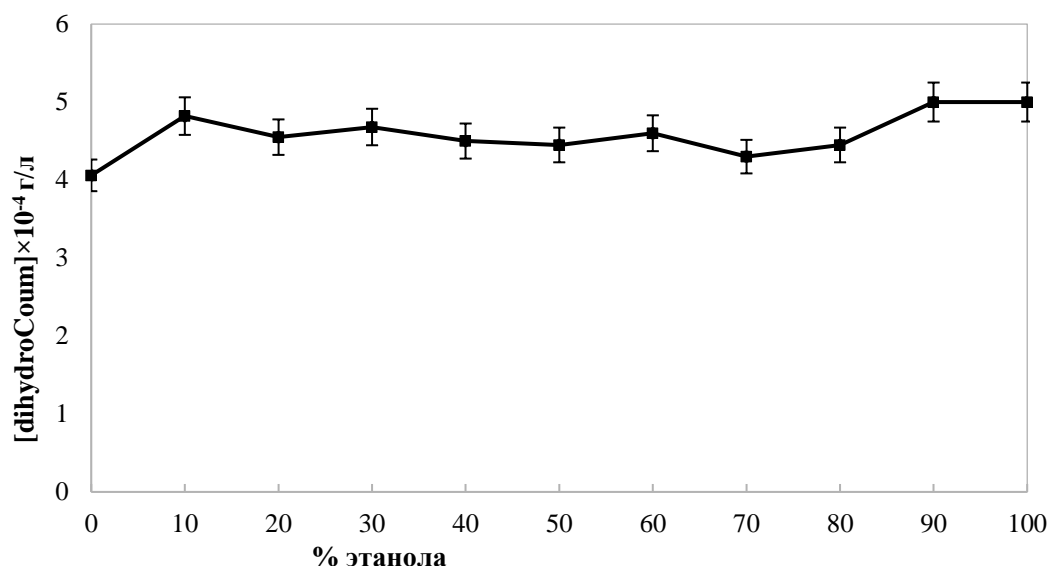


Рисунок 3.3.8 – Зависимость концентрации дигидрокумарина от процентного содержания этилового спирта в системе

Концентрация дигидрокумарина в экстракте донника лекарственного практически не зависит от концентрации экстрагента и равна $(4-5) \times 10^{-4}$ г/л. Объектами дальнейшего исследования послужили 30%, 50% и 70% - ные этанольные экстракты донника лекарственного, чтобы проследить изменения концентрации кумарина после радиолиза. Перед облучением образец объемом 25 мл экстракта донника лекарственного помещали в стеклянные ампулы, деаэрировали. Далее воздействовали на систему ионизирующим излучением $D=6,3$ кГр на установке РХМ- γ -20. Далее облученный раствор обработали по методике 2.2.2. После хроматографирования были получены следующие данные (рис. 3.3.9 - 3.3.11).

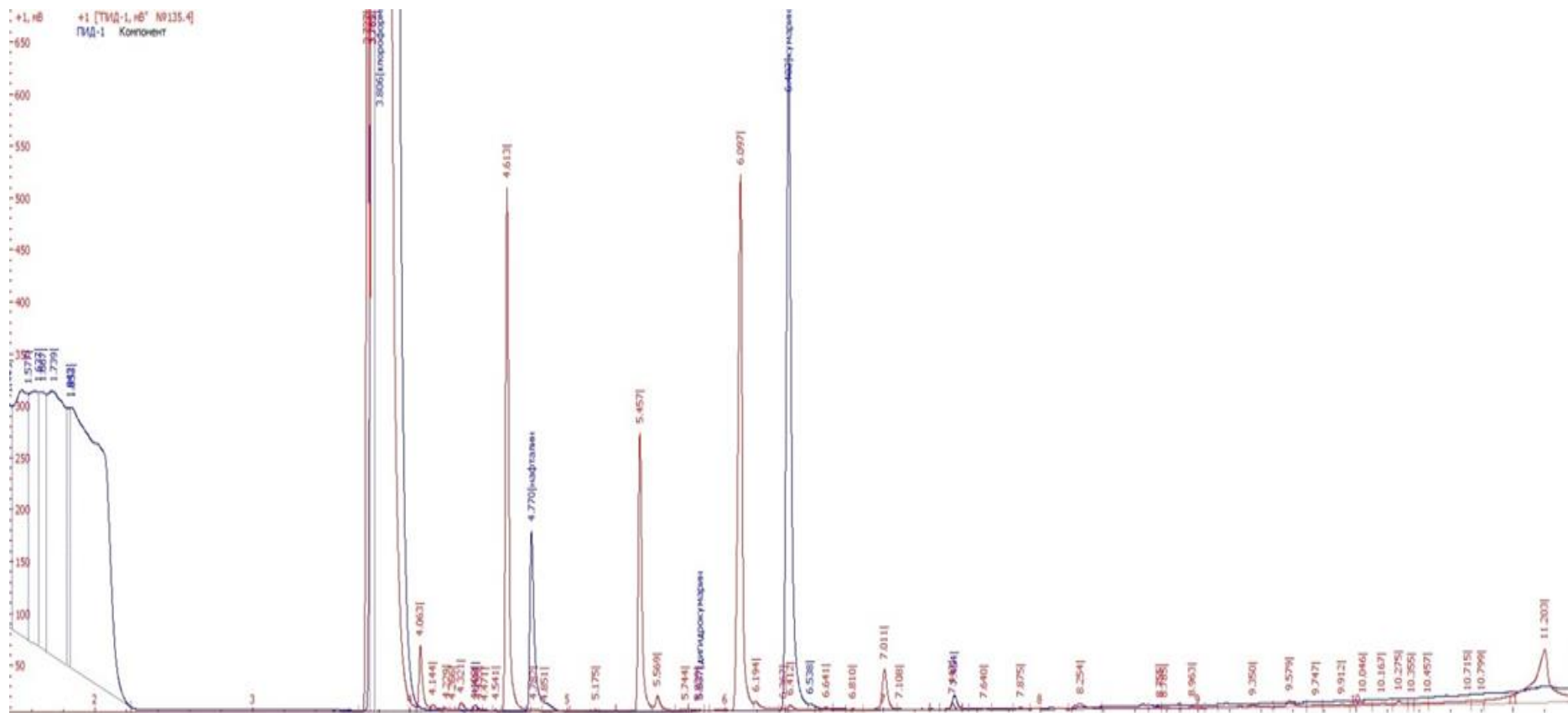


Рисунок 3.3.9 – Хроматограмма 30%-ого экстракта донника лекарственного до (синий) и после (красный) облучения D= 6.3кГр

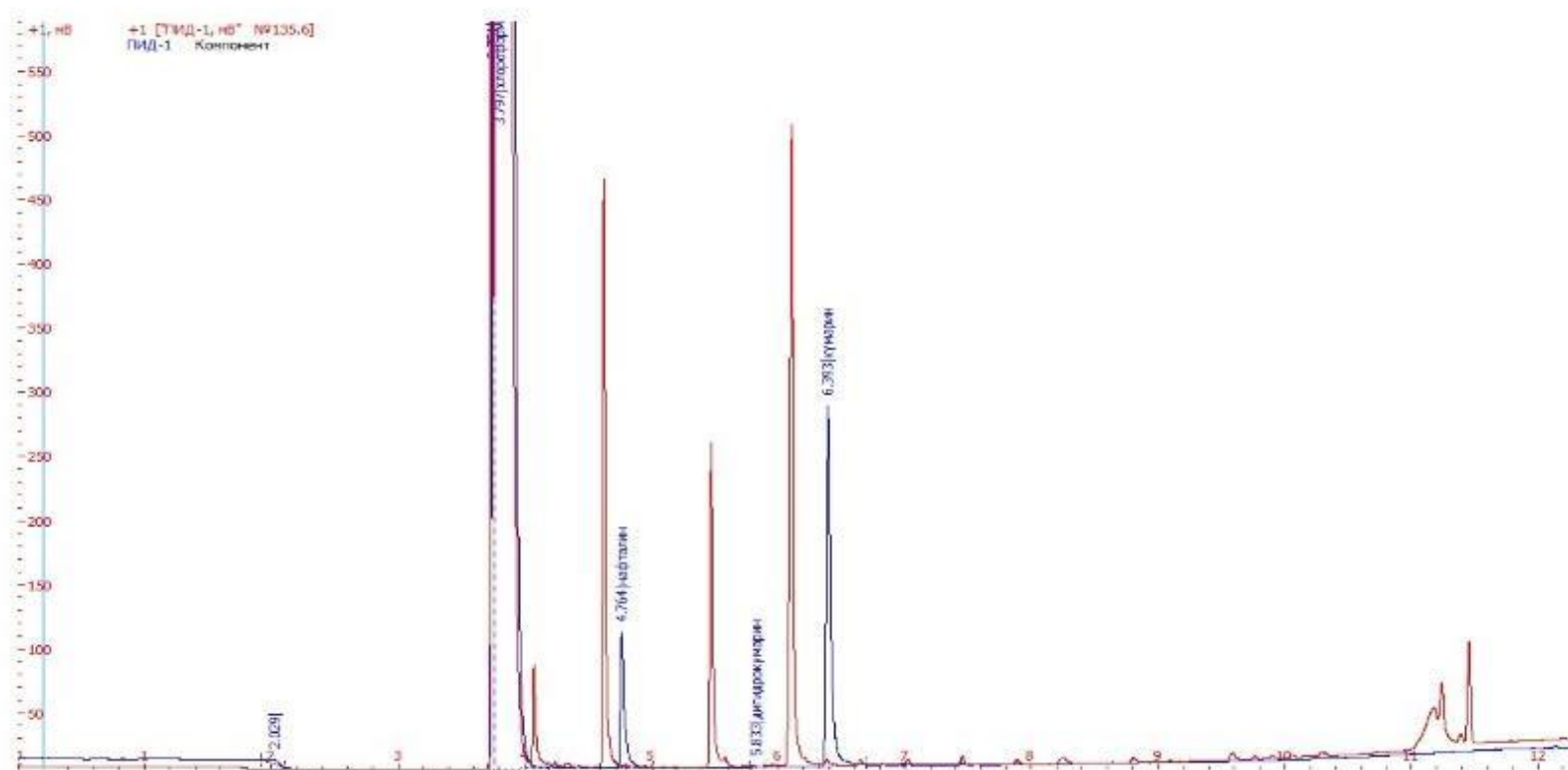


Рисунок 3.3.10 – Хроматограмма 50% -ого экстракта донника лекарственного до (синий) и после (красный) облучения
D= 6.3кГр

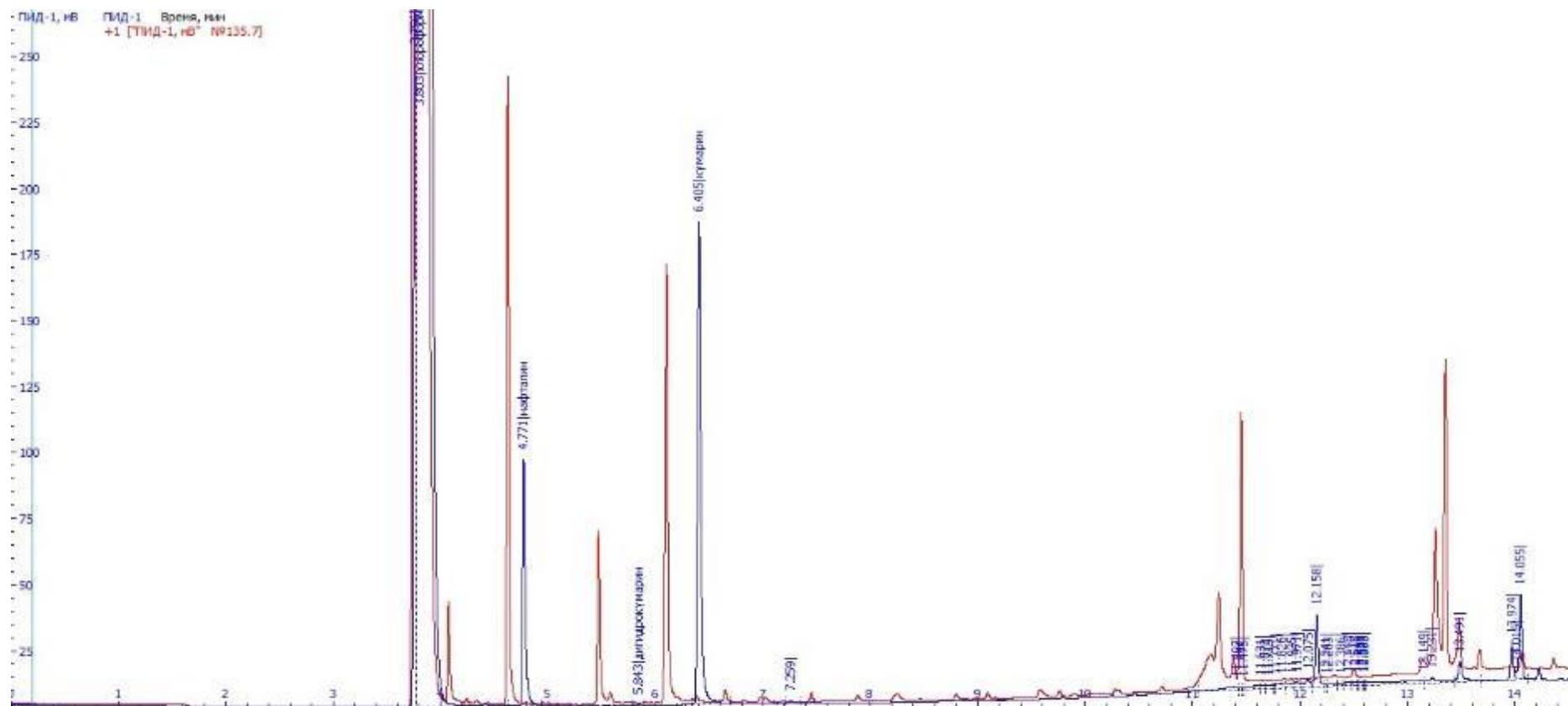


Рисунок 3.3.11 – Хроматограмма 70% -ого экстракта донника лекарственного до (синий) и после (красный) облучения
D= 6.3кГр

С учётом калибровки с нафталином были рассчитаны концентрации кумарина в облучённых растворах с разной концентрацией спирта, которые представлены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Изменение концентраций кумарина с различным содержанием вода-спирт в зависимости от дозы

Содержание спирта в системе, % объем.	[Co _{um}], 10 ⁻⁴ , D = 6 кГр	Исходный [Co _{um}], 10 ⁻⁴	Степень превращения Co _{um} , %
30	2,3	3,2	28,1
50	2,4	2,5	4
70	1,6	2	20

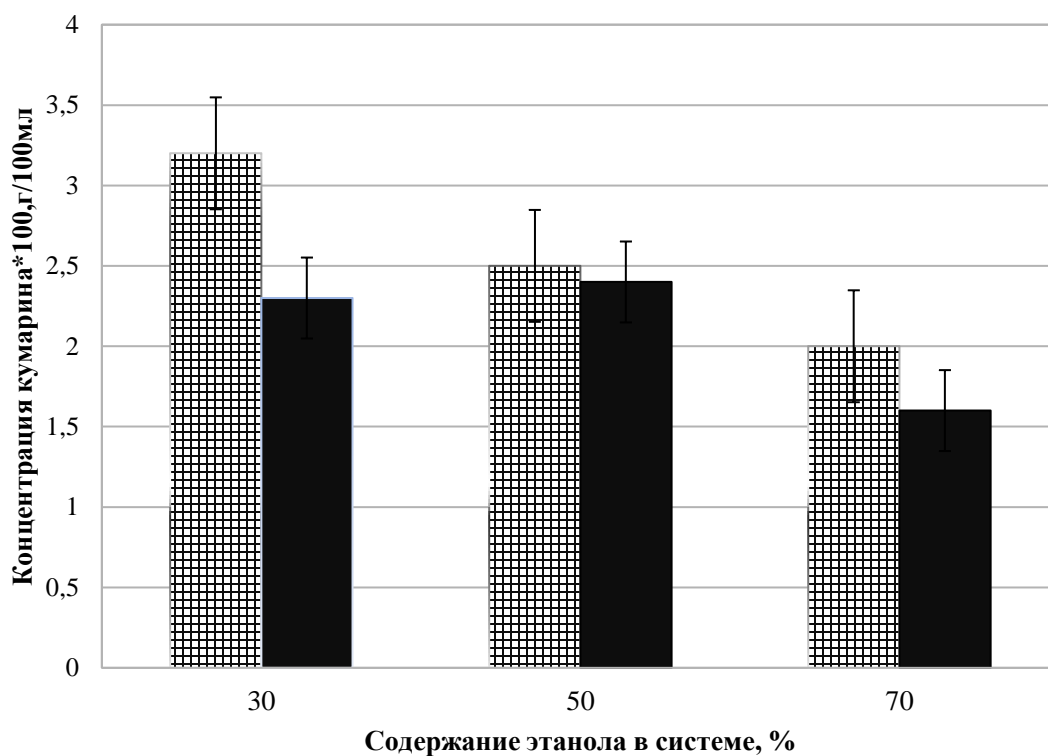


Рисунок 3.3.12 – Изменения концентрации кумарина до облучения (сетка) и после (сплошная заливка) в зависимости от содержания этанола в системе

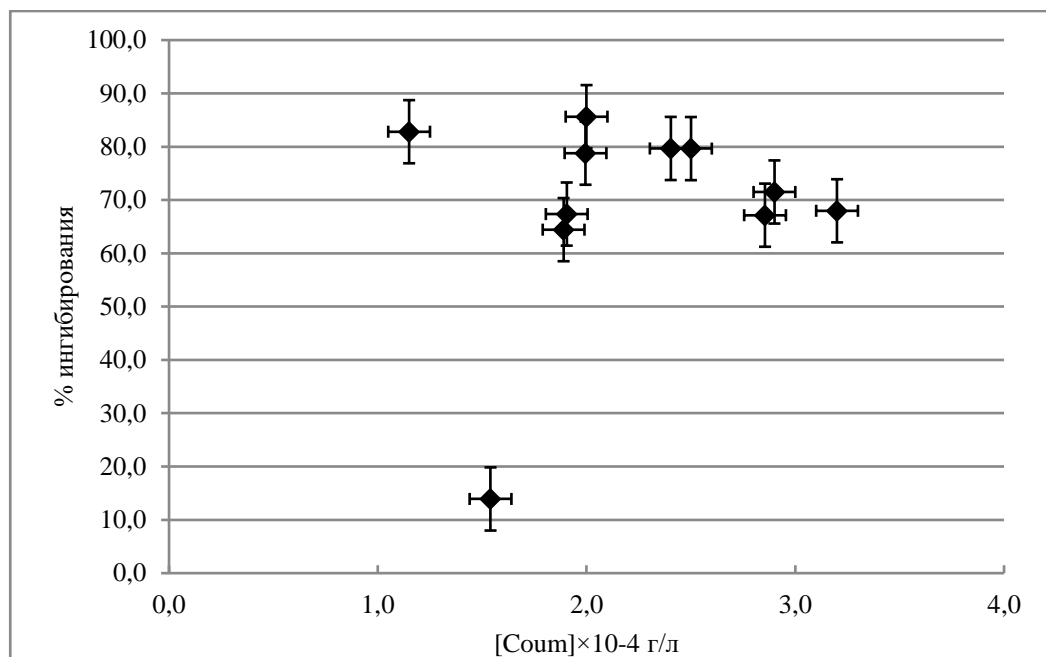


Рисунок 3.3.13 – Зависимость эффекта ингибирования ДФПГ донником от концентрации кумарина в доннике лекарственном

Как видно из рисунка 3.3.13, четкой зависимости антирадикальной активности от концентрации кумарина не было выявлено, поэтому дальнейшие исследования были направлены на изучение реакционной способности кумарина с углерод-центрированными радикалами.

Для детального изучения механизма радиационно-химического превращения кумарина с углеродцентрированными радикалами в системе использовали метод ВЭЖХ, об антирадикальной активности других компонентов – эскулетина и эскулина в экстракте багульника и муррайи будем вести косвенными методами: в реакции с углеродцентрированными радикалами хроматографически оценивать по выходу ацетальдегида с использованием гидразона, в реакции с супероксид анион-радикалами спектрофотометрически с использованием нитросинего тетразолия хлорида.

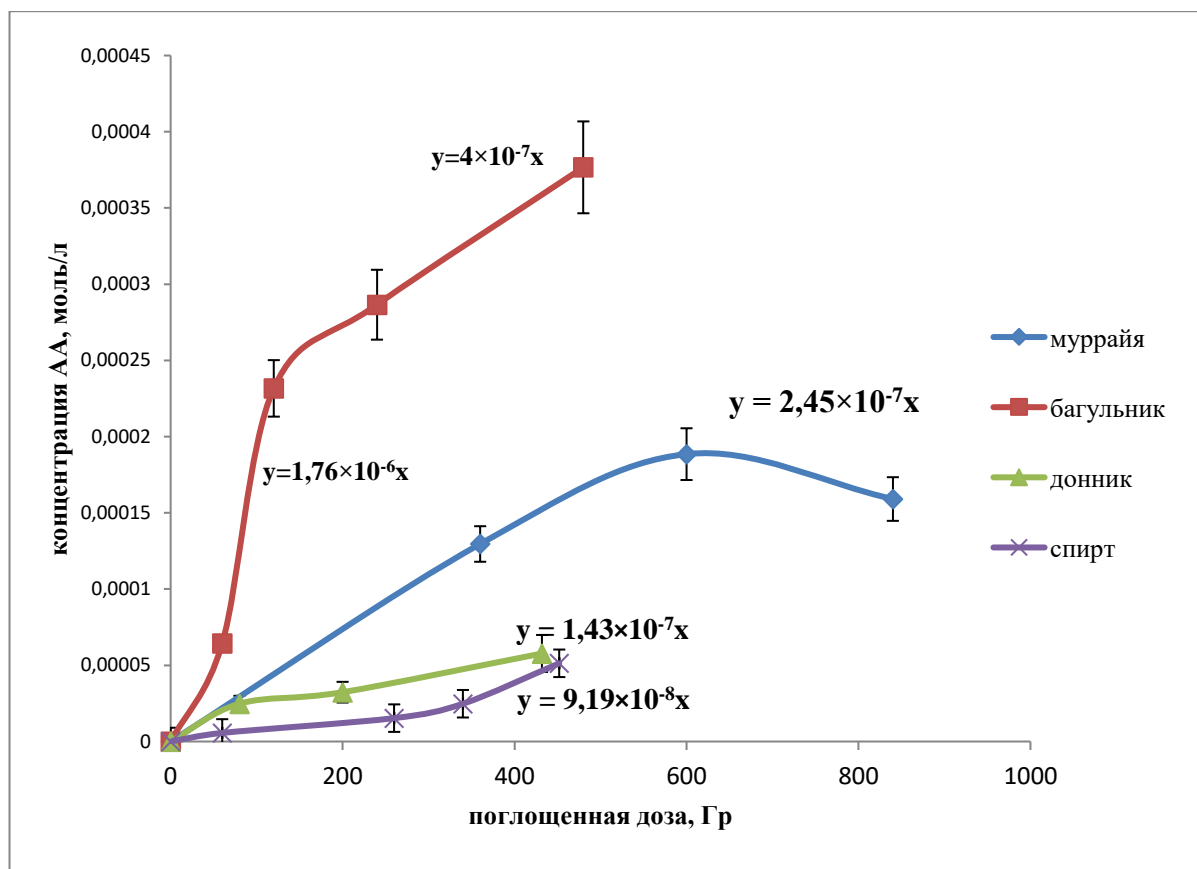


Рисунок 3.3.14 – Накопление ацетальдегида в зависимости от поглощенной дозы

Газо-хроматографически путём определения радиационно-химических выходов ацетальдегида при радиоллизе 70% деаэрированных этанольных экстрактов донника, багульника и муррайи произведена оценка реакционной способности исследуемых экстрактов в реакции с углеродцентрированным радикалом. О реакционной способности кумаринсодержащих экстрактах из донника, багульника и муррайи перехватывать углеродцентрированные радикалы при радиоллизе будем оценивать по выходу АА с помощью газовой хроматографии. При радиоллизе деаэрированного этанола основными молекулярными продуктами являются ацетальдегид (АА) и бутандиол-2,3 (БД):

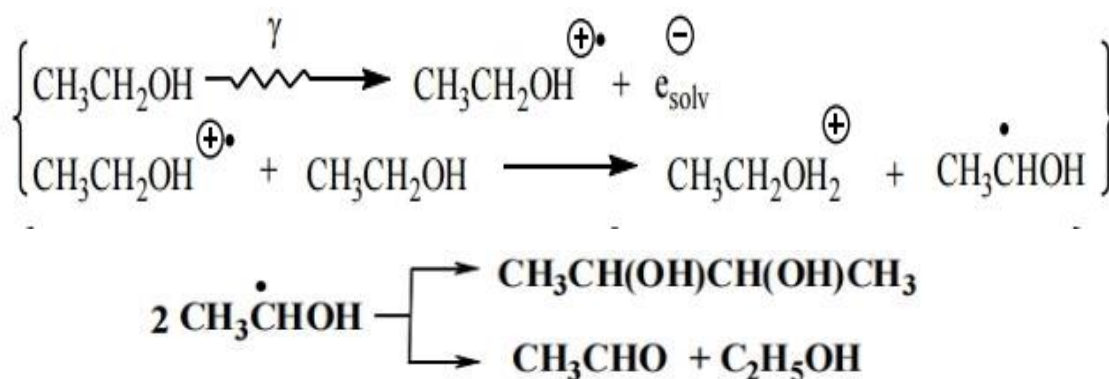


Рисунок 3.3.15 – Радиолит деаэрированного этанола

На рисунке 3.3.14 представлены кривые накопления ацетальдегида в системе в зависимости от увеличения поглощённой дозы для трёх исследуемых 70% деаэрированных экстрактов донника, багульника, муррайи. Значения рассчитанных выходов АА по формуле (8) представлены в таблице 3.3.2.

$$G_{\text{AA}} = \frac{9,65 \cdot 10^9 \cdot C_{\text{AA}}}{\rho \cdot D}, \quad (8)$$

где C_{AA} – концентрация АА, моль/л; ρ – плотность растворителя, г/л; D – поглощённая доза, Гр.

Таблица 3.3.2 – Радиационно-химический выход (G) ацетальдегида в 70% водно-этанольных деаэрированных системах в присутствии и отсутствии экстрактов

Исследуемая система	G, молекул/100эВ	Исследуемая система	G, молекул/100эВ
этанол	1.0	багульник (0–120 Гр)	20.0
донник	1.6	багульник (120–480 Гр)	4.5
муррайя	2.8		

Из литературных данных известно, что максимальное значение радиационно-химического выхода АА не превышает 5.5 молекул/100 эВ. Для багульника в интервале доз от 0 до 120 Гр рассчитан радиационно-химический выход АА, равный ≈ 20 молекул/100 эВ, что может свидетельствовать о свободно-радикальных цепных процессах, происходящих в экстракте после облучения. Можно сделать вывод, что использование багульника в медико-биологической практике возможно только при низких концентрациях.

В деаэрированных 70% водно-этанольных (объем. этанола) экстрактах донника, багульника, муррайи реакционная способность по отношению к углеродцентрированным радикалам, инициированных облучением, оценена по радиационно-химическому выходу ацетальдегида, который уменьшается в ряду багульник > муррайя > донник.

3.4 Определение антирадикальных свойств водно-этанольных экстрактов и некоторых кумаринов 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом после воздействия ионизирующего излучения

Суть метода заключается в снижении оптической плотности раствора ДФПГ в присутствии добавок веществ – экстрактов кумаринсодержащих лекарственных растений и синтетических кумаринов.

Исследования производились согласно методике. Данные экспериментов представлены в таблице 3.4.1.

Таблица 3.4.1 – Оптическая плотностьДФПГ в зависимости от концентрации добавок лекарственных веществ. Измерения при длине волны 517 нм

V, мкл	Багульник	Донник	Ромашка	Багульник,
контроль	1,162	1,145	0,964	1,835
40	0,622	1,108	0,885	1,008
100	0,106	1,066	0,814	0,859
200	0,1	0,958	0,647	0,502
300	0,11	0,959	0,475	0,211
400	0,096	0,708	0,305	0,23
500	0,094	0,689	0,142	0,135

Ранее было показано, что в доннике содержится кумарин, в багульнике болотном производные кумарина - эскулетин, эскулин, умбеллиферон, скополетин.

Для оценки реакционной способности спиртовых экстрактов лекарственных растений рассчитывали процент ингибированияДФПГ в зависимости от концентрации (введенной добавки экстракта):

$$\% \text{ ингибированияДФПГ} = 100 \cdot (D_k - D_o) / D_k, \quad (3.5)$$

где D_k – оптическая плотность в отсутствии антиоксидантов (контроль);

D_o – оптическая плотность в присутствии антиоксидантов.

По полученным данным построили зависимости (рис. 3.4.1) эффекта ингибирования от объема вводимой добавки экстракта растений.

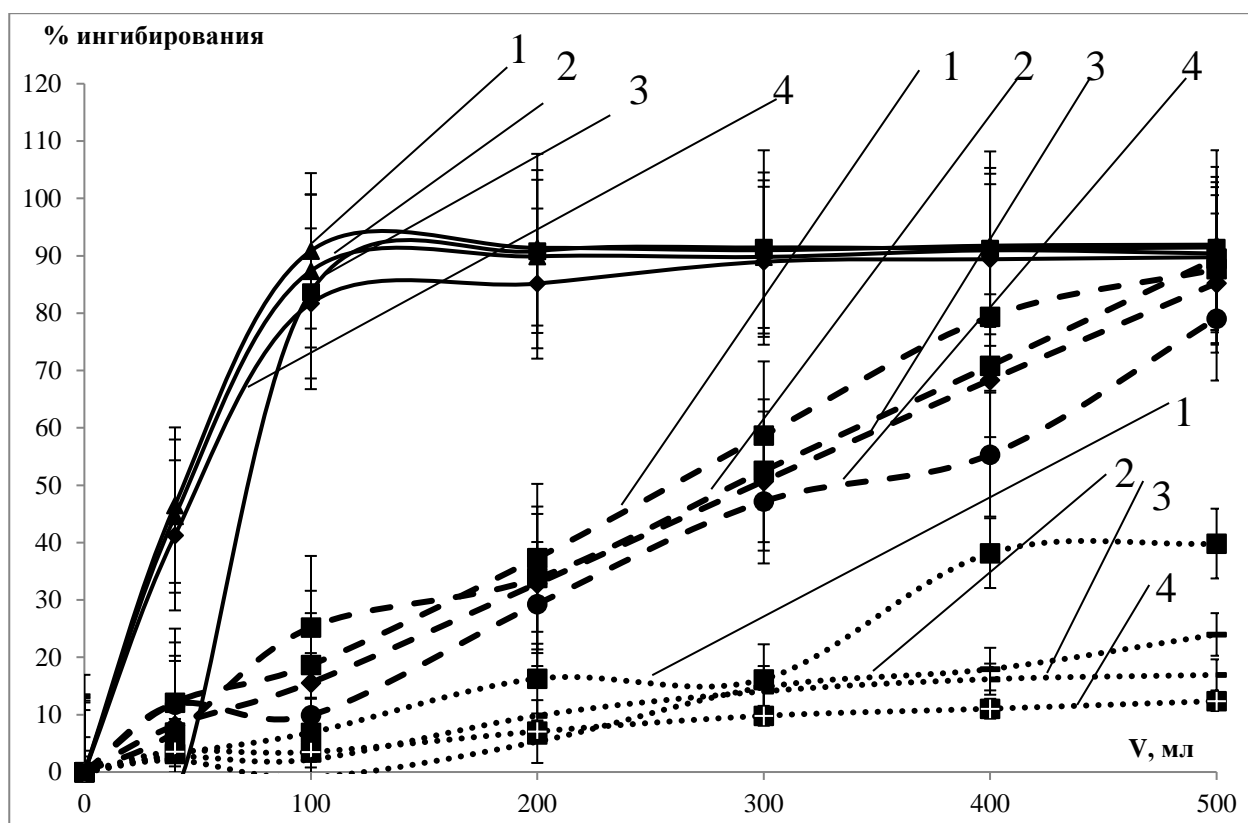


Рисунок 3.4.1 – Процент ингибирования ДФПГ для: — багульника болотного, донника лекарственного, - - - ромашки лекарственной в зависимости от дозы облучения (кГр): 1–0, 2 – 0.36, 3 - 1.1, 4 –7.6

Наивысшая реакционная способность наблюдается для экстрактов из багульника болотного, причём воздействие ионизирующего излучения существенно не влияет на характер кривых. Средней антирадикальной активностью обладает экстракт ромашки. Пропорционально концентрации активных веществ возрастает процент ингибирования, а значит значения антирадикальной активности. Наименьшая реакционная способность зарегистрирована у растворов донника лекарственного.

3.4.1 Реакционная способность водно-этанольных экстрактов багульника, и донника в реакции с 2,2- дифенил-1-пикрилгидрозилом

Далее рассмотрим взаимодействие водно-спиртовых растворов донника лекарственного со стабильным радикаломДФПГ.

Таблица 3.4.2 – Зависимость оптической плотности от времени ингибирования для водно-спиртовых растворов донника лекарственного

	5 мин.	10 мин.	15 мин.	20 мин.	25 мин.	30 мин.
0%	0,298	0,229	0,209	0,191	0,179	0,160
10%	0,198	0,133	0,129	0,126	0,122	0,121
20%	0,199	0,285	0,289	0,283	0,279	0,275
30%	0,463	0,393	0,323	0,275	0,272	0,226
40%	0,419	0,352	0,301	0,261	0,242	0,218
50%	0,286	0,223	0,199	0,189	0,173	0,167
60%	0,239	0,192	0,183	0,175	0,173	0,171
70%	0,315	0,242	0,214	0,192	0,180	0,169
80%	0,395	0,348	0,311	0,292	0,277	0,262
90%	0,429	0,383	0,340	0,319	0,302	0,283
100%	0,782	0,761	0,747	0,737	0,732	0,723
Контроль	0,873	0,865	0,859	0,854	0,850	0,847

По зависимости полученных результатов табл. 3.4.2 можно заключить, что исходные водно-спиртовые растворы донника реагируют со стабильным радикаломДФПГ с уменьшением оптической плотности, что свидетельствует о проявлении антирадикальной активности.

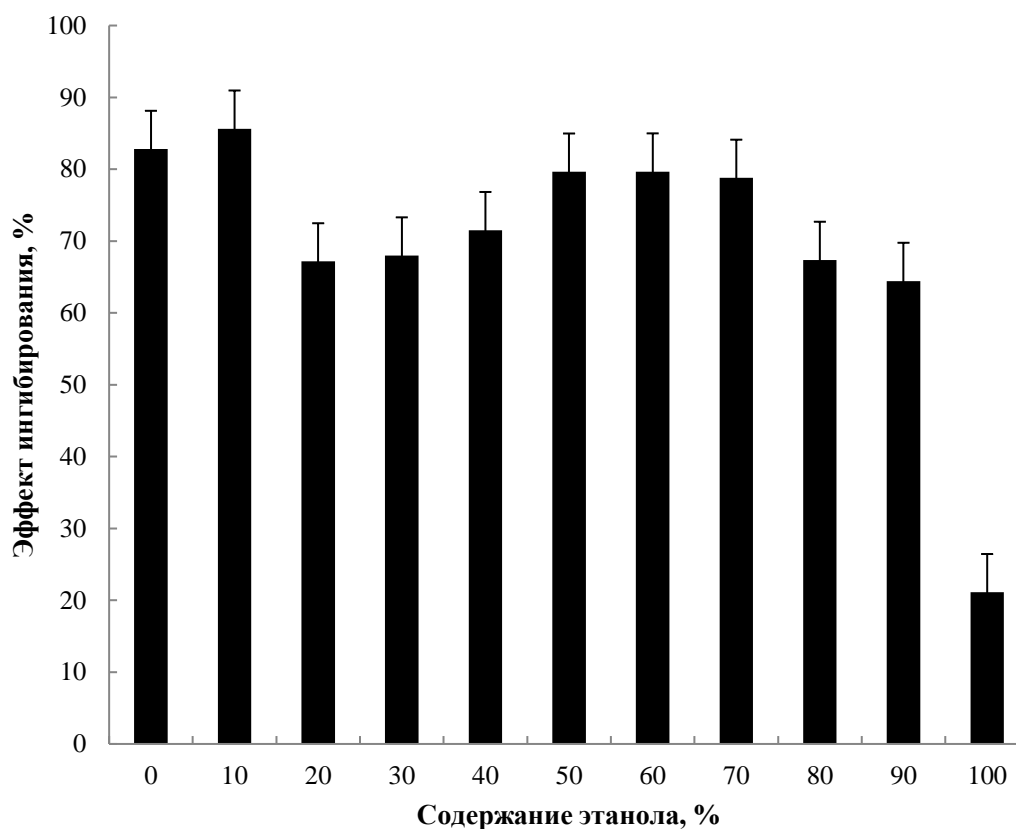


Рисунок 3.4.2 –Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами донника лекарственного от содержания этанола в растворах

При добавке исходных экстрактов багульника болотного в систему с ДФПГ было определено, что багульник демонстрирует 100%-ную антирадикальную активность. Следовательно, для целесообразного определения и сравнения данных с полученными ранее данными по доннику лекарственному и муррайе растворы багульника были разбавлены. В таблице 3.4.3 представлены значения оптической плотности при 517 нм экстрактов багульника болотного, разбавленных в 10 раз, на основании которых осуществляли экспрессный анализ активности экстрактов, разбавленных в 10 раз, в зависимости от соотношения вода-спирт [183].

Таблица 3.4.3 – Взаимодействие водно-спиртовых экстрактов багульника с 0,2 мМ растворомДФПГ.

% спирта	Опт. плотность, отн.ед.	% ингибирования
0	0,479	17,9
10	0,539	22,3
20	0,306	55,9
30	0,089	87,2
40	0,073	89,4
50	0,077	88,9
60	0,065	90,6
70	0,057	90,5
80	0,070	91,8
90	0,072	89,9
100	0,693	89,6
Контроль	0,717	

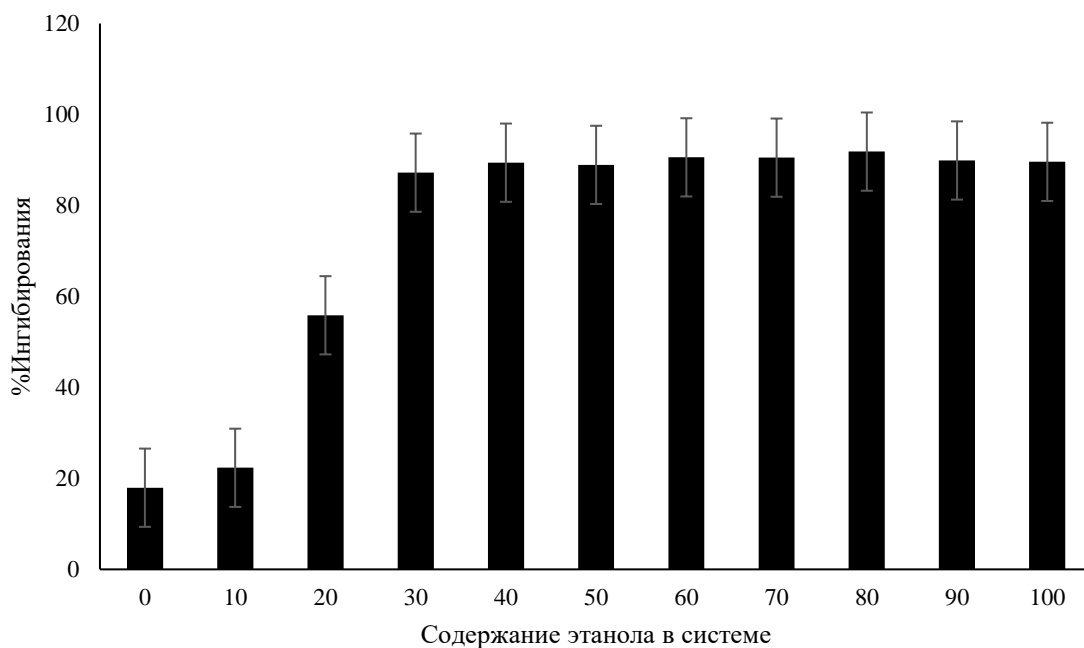


Рисунок 3.4.3 – Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе.

Далее экстракты багульника болотного разбавлялись в 20 раз (рис. 3.4.4), 30 раз (рис. 3.4.5) и 100 раз (рис. 3.4.6) и проводилась реакция с ДФПГ в течение 30 минут.

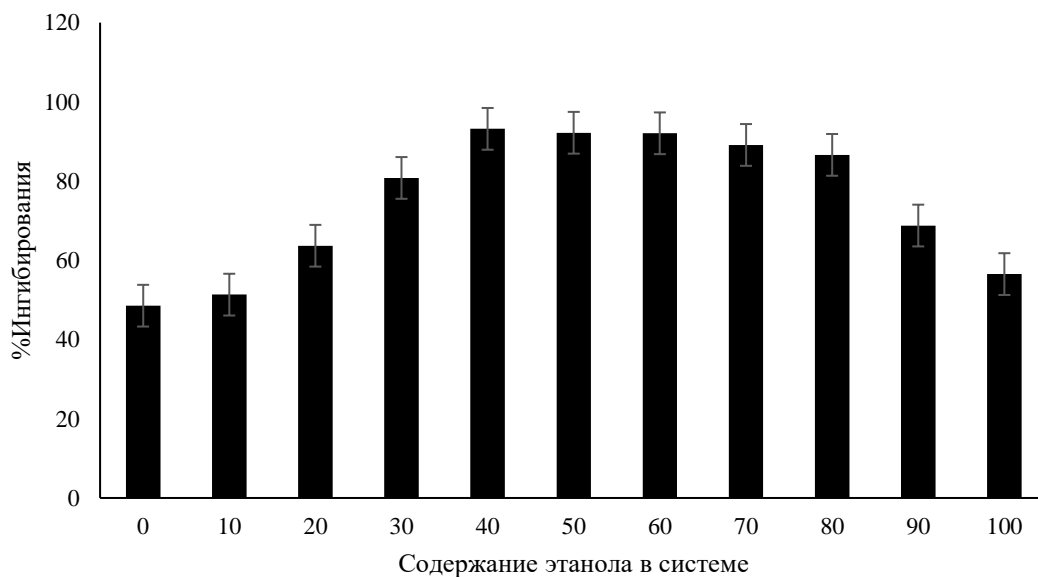


Рисунок 3.4.4 – Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе.

Таблица 3.4.4 – Взаимодействие водно-спиртовых растворов, разбавленных в 20 раз с 0,2 мМ растворомДФПГ

% спирта	Опт. плотность, отн.ед.	% ингибирования
0	0,301	48,5
10	0,349	51,3
20	0,260	63,7
30	0,138	80,8
40	0,049	93,2
50	0,056	92,2
60	0,057	92,1
70	0,078	89,1
80	0,096	86,6
90	0,224	68,8
100	0,312	56,5
Контроль	0,717	

Таблица 3.4.5–Взаимодействие водно-спиртовых растворов багульника, с 0,2 мМ растворомДФПГ

% спирта	Опт. плотность, отн.ед.	% ингибирования
0	0,391	33,1
10	0,491	34,1
20	0,416	44,2
30	0,294	60,6
40	0,119	83,9
50	0,195	73,8
60	0,127	83
70	0,184	75,3
80	0,334	55,2
90	0,358	52
100	0,389	47,9
Контроль	0,7455	

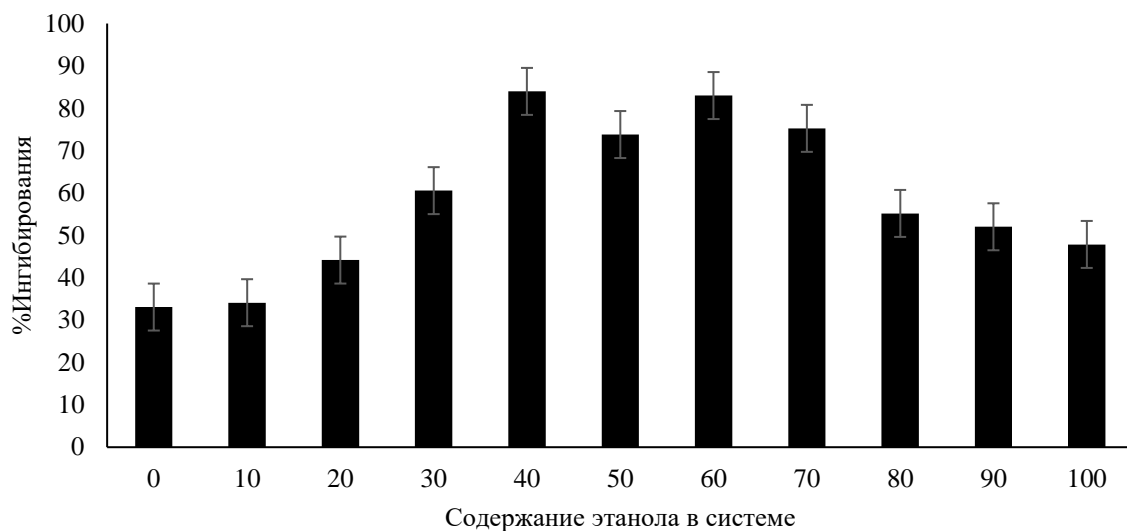


Рисунок 3.4.5 – Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе.

Таблица 3.4.6 – Взаимодействие водно-спиртовых растворов багульника, с 0,2 мМ раствором ДФПГ

% спирта	Опт. плотность, отн. ед.	% ингибирования
0	0,562	0,04
10	0,712	1
20	0,663	7,8
30	0,655	8,9
40	0,632	12,2
50	0,612	14,9
60	0,611	15,1
70	0,593	17,6
80	0,633	11,9
90	0,688	4,4
100	0,711	1,2
Контроль	0,719	

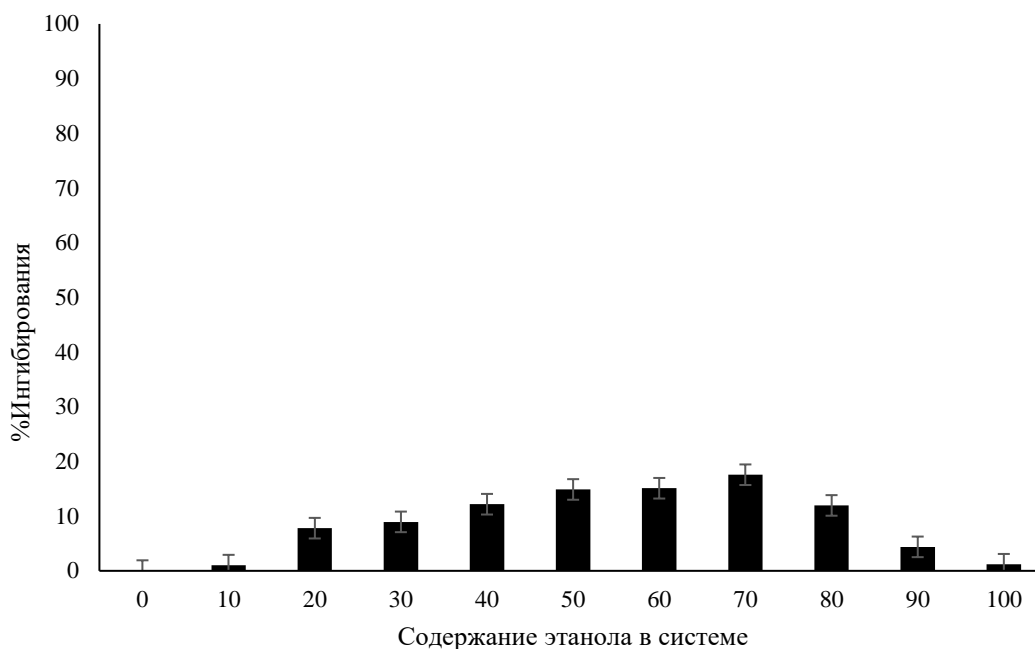


Рисунок 3.4.6 – Эффект ингибирования ДФПГ экстрактами багульника в зависимости от содержания этанола в системе.

Ниже рассмотрим поведение 40% и 60% экстрактов багульника болотного в реакции со стабильным радикалом ДФПГ. Кинетика реакции 40% экстракта багульника болотного, разбавленного в 30 раз в реакции с ДФПГ (рис. 3.4.7). На протяжении измерения (30 минут) образцы находились в темноте.

Таблица 3.4.7 – Изменение оптической плотности 40% и 60% экстрактов багульника в зависимости от времени выдерживания в темноте при реакции с ДФПГ

Время выдерживания в темноте, мин	Опт. плотность, 40% этанольный экстракт багульника	Опт. плотность 60% этанольный экстракт багульника
5	0,269	0,279
10	0,227	0,243
15	0,195	0,220
20	0,179	0,209
25	0,168	0,192
30	0,154	0,180
Контроль	0,715	

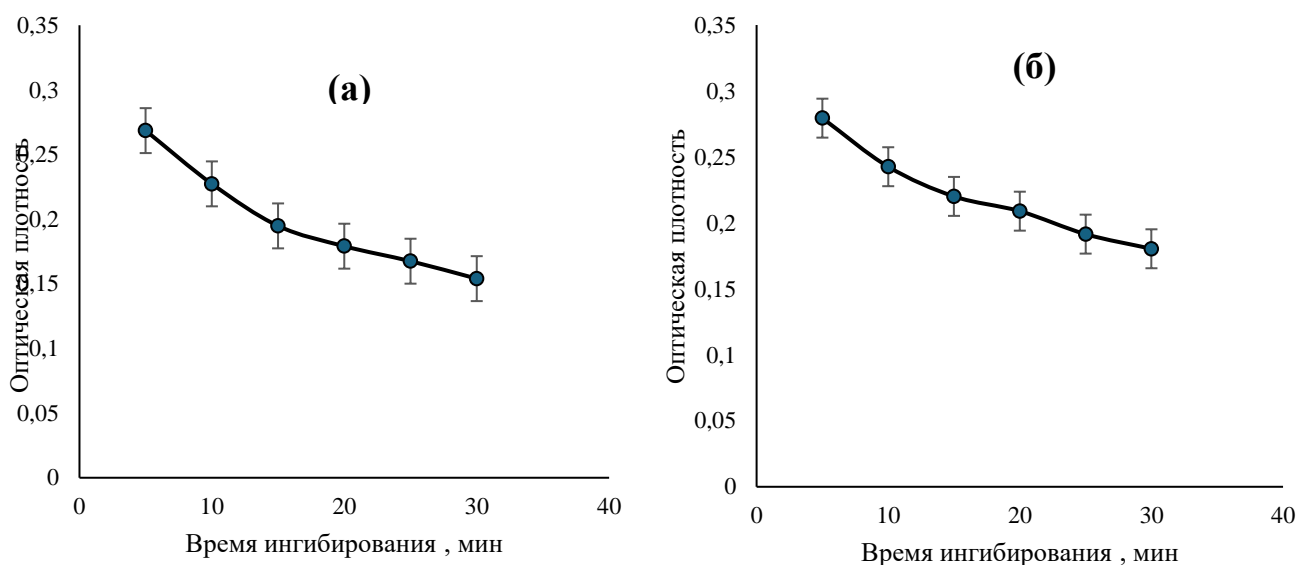


Рисунок 3.4.7 – Изменения оптической плотности экстрактов багульника болотного: (а) – 40% объем этанола, (б) - 60% объем этанола, от времени хранения в темноте при реакции с ДФПГ. Длина волны 517 нм

Полученные данные оптической плотности для 40% и 60% экстрактов от времени свидетельствуют о взаимодействии экстракта со стабильным радикалом ДФПГ, падение оптической плотности происходит на 30-40% за время 30 минут и далее изменений не зарегистрировано.

Далее экстракты, разбавленные в 30 раз, были облучены различными дозами на установке РХМ- γ -20.

При воздействии дозой 0,71 кГр на аэрированные экстракты багульника зарегистрировано уменьшение антирадикальной активности для 40 % экстракта на 45 %, для 60% экстракта на 37%, при более высокой дозе ионизирующего излучения значение эффекта ингибирования в реакции с ДФПГ равно 50–64% без значительного изменения от дозы.

Таблица 3.4.8 – Зависимость эффекта ингибирования экстрактов багульника болотного, в реакции с ДФПГ от дозы облучения

D, кГр	Опт. плотность, отн.ед.		%Ингибирования	
	40% объем. этанол	60%	40%	60%
необл	0,119	0,127	84,0	83,0
0,071	0,503	0,442	45,6	52,2
0,141	0,446	0,401	51,8	56,6
0,212	0,418	0,440	54,8	52,4
0,282	0,334	0,404	63,9	56,3
0,564	0,311	0,296	59,0	61,0
0,846	0,253	0,272	56,8	53,5

3.4.2 Реакционная способность водно-этанольных экстрактов муррайи в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом

Для определения реакционной способности экстрактов из муррайи применяли свежеприготовленные растворы 0,2 мМ стабильного радикала ДФПГ. В таблице 3.4.9 представлены значения оптической плотности при 517 нм экстрактов

муррайи метельчатой с различными временами облучения, на основании которых осуществляли экспрессный анализ активности экстрактов в зависимости от содержания вода-этанол.

По данным таблицы 3.4.9 построены гистограммы с различной концентрацией вода-спирт в зависимости от дозы (рисунки 3.4.8-3.4.10).

Таблица 3.4.9 – Процент ингибированияДФПГ экстрактами муррайи в зависимости от дозы облучения в присутствии кислорода

% объем. этанола	Опт. плотн., необл. раствор	% ингиб-я необл. раствор	Опт.плотн., D=0,81 кГр	% ингиб-я, D=0,81 кГр	Опт.плотн., D=4,73 кГр	% ингиб-я, D=4,73 кГр
0	0,289	67,7	0,566	57,1	0,353	60,5
10	0,280	68,7	0,516	60,9	0,373	58,3
20	0,281	68,6	0,429	67,5	0,311	65,2
30	0,241	73,0	0,414	68,6	0,292	67,3
40	0,235	73,7	0,359	73,1	0,237	73,5
50	0,199	77,7	0,519	61,0	0,207	76,9
60	0,208	76,7	0,301	77,2	0,201	77,5
70	0,195	78,2	0,281	78,7	0,221	75,3
80	0,185	89,3	0,347	73,7	0,246	72,5
90	0,301	66,3	0,48	63,6	0,408	54,4
100	0,602	31,0	0,916	30,6	0,811	9,3

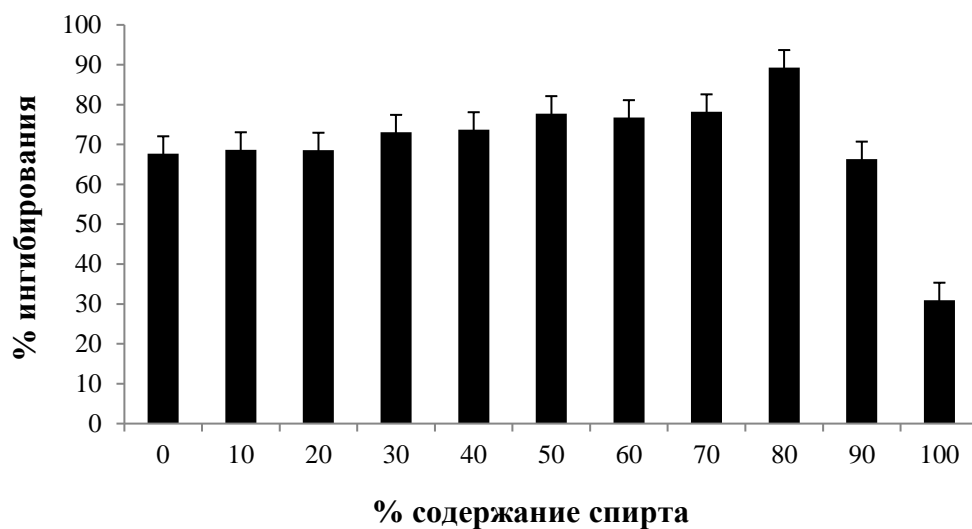


Рисунок 3.4.8 – Эффект ингибирования ДФПГ необлученным экстрактом муррайи от содержания этанола в системе

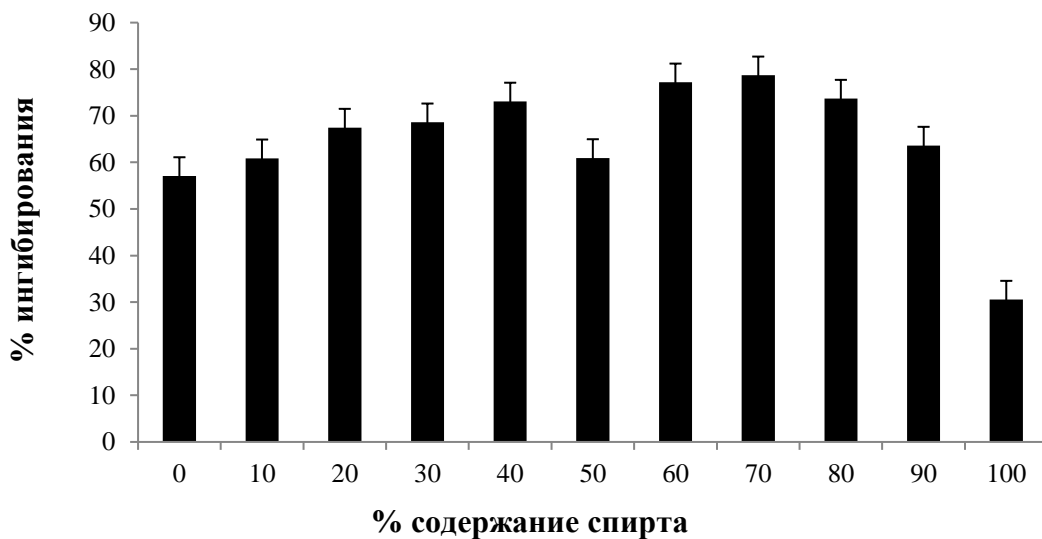


Рисунок 3.4.9 – Зависимость эффекта ингибирования от содержания этанола в системе в экстракте муррайи после облучения дозой $D = 0,81$ кГр

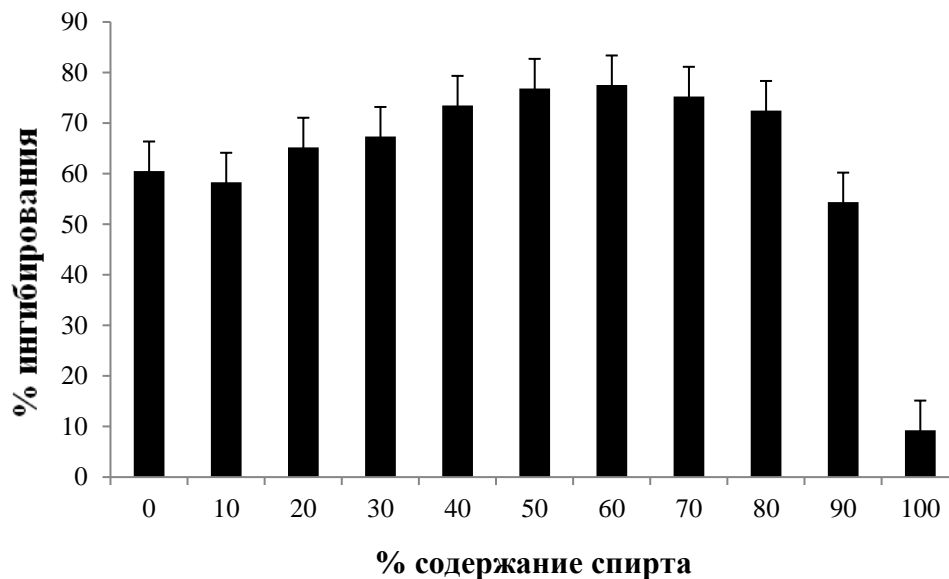


Рисунок 3.4.10 – Зависимость эффекта ингибирования от содержания этанола в системе в экстракте муррайи после облучения дозой $D = 4,73$ кГр

Показано, что эффект ингибирования ДФПГ экстрактами муррайи после воздействия дозами 0,81 кГр и 4,73 кГр остаётся высокой. Далее был исследован эффект ингибирования в реакции с ДФПГ для 70% экстракта муррайи в зависимости от её добавки в систему.

Таблица 3.4.10 – Изменение эффекта ингибирования в зависимости от добавки экстракта в систему с ДФПГ

объём добавки, мкл	A, отн.ед.	% ингибирования
0	1,173	0
50	0,681	41,9
100	0,582	50,4
150	0,393	66,5
180	0,327	72,1
200	0,306	73,9

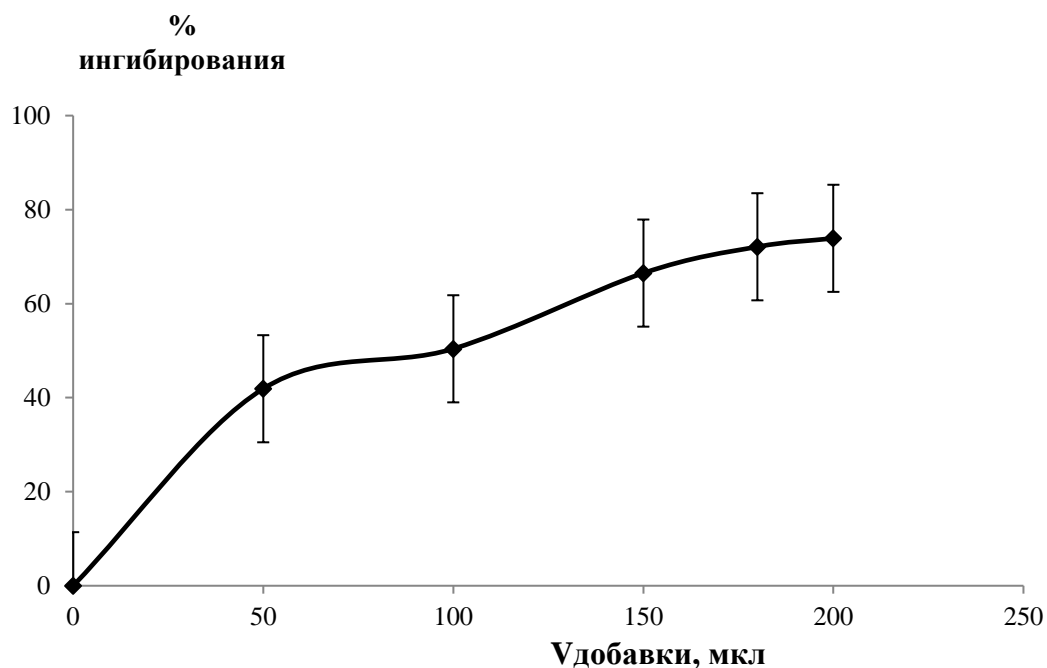


Рисунок 3.4.11 – Зависимость эффекта ингибирования от добавки 70% экстракта в систему

Затем разбавленные в 2 раза экстракты 70% муррайи метельчатой были облучены различными дозами, и был произведен анализ зависимости антирадикальной активности от добавки экстракта в систему с использованием стабильного радикала ДФПГ (табл. 3.4.11).

Таблица 3.4.11 – Изменение эффекта ингибирования ДФПГ экстрактами 70% муррайи, разбавленной в 2 раза, при увеличении добавки и дозы облучения

Объем добавки, мкл	%ингибирования 0 кГр	%ингибирования 0,27 кГр	%ингибирования 1,08 кГр	%ингибирования 5,94 кГр	%ингибирования 6,48 кГр
50	0,8	3,0	12,5	16,3	17,9
100	20,7	14,0	4,7	26,7	35,1
150	38,3	34,4	24,4	39,2	45,9
180	45,9	47,3	28,5	46,3	52,0
200	51,0	55,0	38,5	49,7	57,4

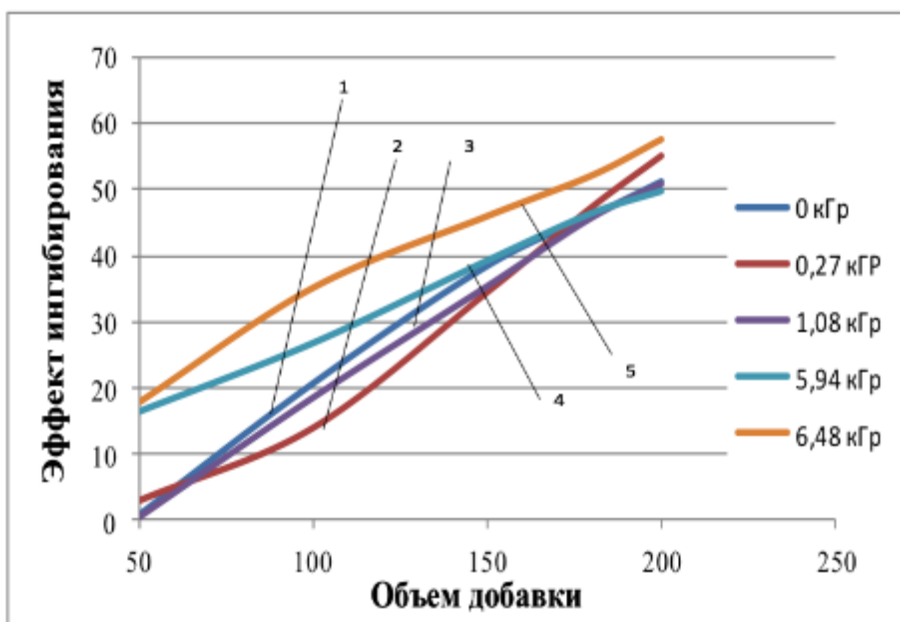


Рисунок 3.4.12 – Изменение эффекта ингибирования при 517 нм 70% экстрактами муррайи, разбавленного в 2 раза, в зависимости от добавки его в систему с ДФПГ при различных дозах облучения (кГр): 1 – 0, 2 – 0.27, 3 – 1.08, 4 – 5.94, 5 – 6.48

Из графика 3.4.12 видно, что при дозах облучения 0,27 кГр и 1,08 кГр эффект ингибирования ДФПГ экстрактами муррайи [184] уменьшается по сравнению с необлученным, а при дозах выше 6 кГр наблюдается увеличение восстанавливающей способности экстракта муррайи в реакции с ДФПГ. Подобная картина наблюдалась и исследованных экстрактов донника и багульника, для которых спектрофотометрически зарегистрировано уменьшение концентрации биологически-активных веществ в системе от дозы облучения, но увеличение ингибирующей способности в реакции с ДФПГ.

3.4.3 Реакционная способность некоторых кумаринов в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозилом

В качестве исследуемых веществ были взяты эскулетин, эскулин, скополетин и умбеллиферон, которые, как известно, из литературных данных содержатся в экстрактах багульника болотного и муррайи метельчатой, и с которыми связывают проявление антирадикальной восстановительной активности. В качестве растворителя был выбран 40% этиловый спирт, концентрации производных кумарина равны 0,01М.

Таблица 3.4.12 – Процент ингибированияДФПГ кумарин-производными соединениями

Вещество	Опт.плотность	Ингибирования,%
Эскулетин	0,084	82,2
Эскулин	0,410	12,6
Скополетин	0,435	7,3
Умбеллиферон	0,466	0,7
Контроль	0,469	

Таблица 3.4.13 – Процент ингибированияДФПГ кумаринпроизводными соединениями в зависимости от дозы облучения в присутствии кислорода

D, кГр	Эффект ингибирования (%) кумаринпроизводных синтетических соединений			
	эскулетин	эскулин	скополетин	умбеллиферон
0,14	79,5	20,3	10,5	1,8
0,28	82,1	14,3	2,4	12,7
0,56	84,3	16,2	8,3	16,6

Из рис. 3.4.13 видно, что эскулетин проявляет большую антирадикальную активность в реакции с ДФПГ, и с ним связываем антирадикальные восстановительные свойства в кумаринсодержащих экстрактах.

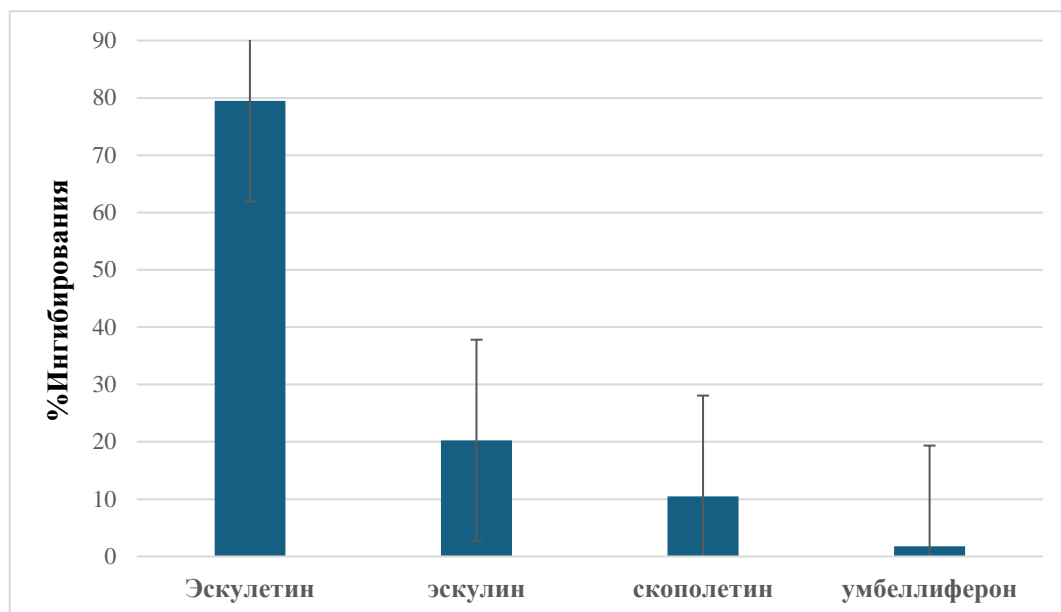


Рисунок 3.4.13 – Проявление антирадикальных свойств этанольных (40% объем.по этанолу) 0.01 М растворов эскулетина, эскулина, скополетина и умбеллиферона

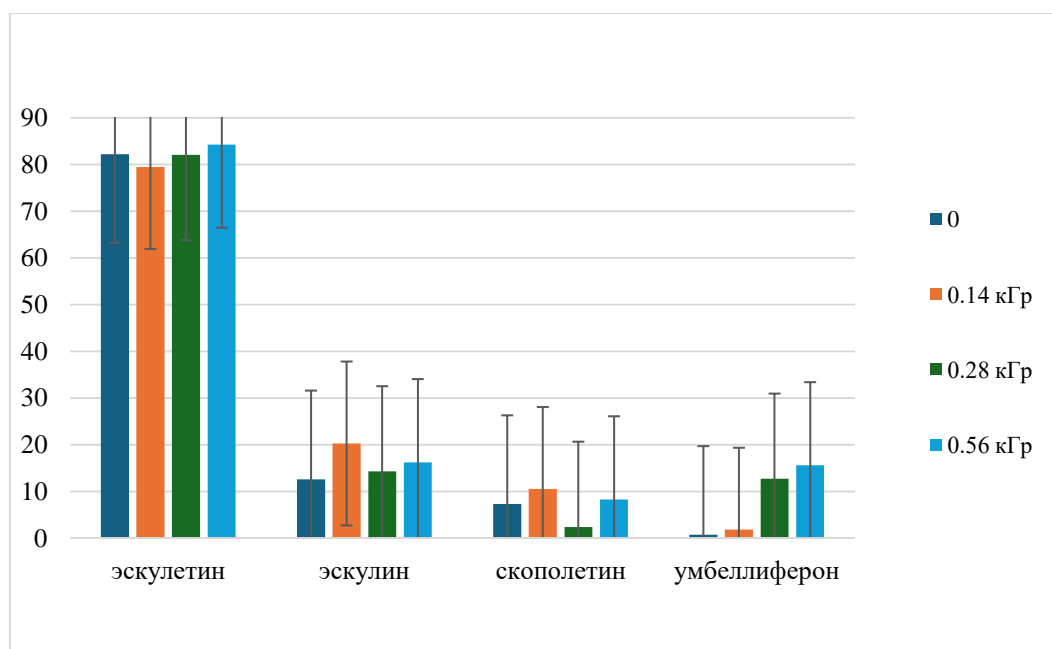


Рисунок 3.4.14 – Проявление антирадикальных свойств кумарин-производных соединений в зависимости от дозы облучения.

3.5 Определение радиопротекторной активности багульника и донника

Известно, что выход ионов калия может служить показателем радиопротекторной активности раствора: чем меньше концентрация ионов калия, тем больше проявление радиопротекторной способности экстракта или индивидуального компонента.

По методике (раздел 2.2.1) получены водные растворы кумарина. На основании методики, указанной в п. 2.12.1, проведен анализ радиопротекторной активности выделенных кумаринов по отношению к дрожжевым клеткам расы Феодосия-7.

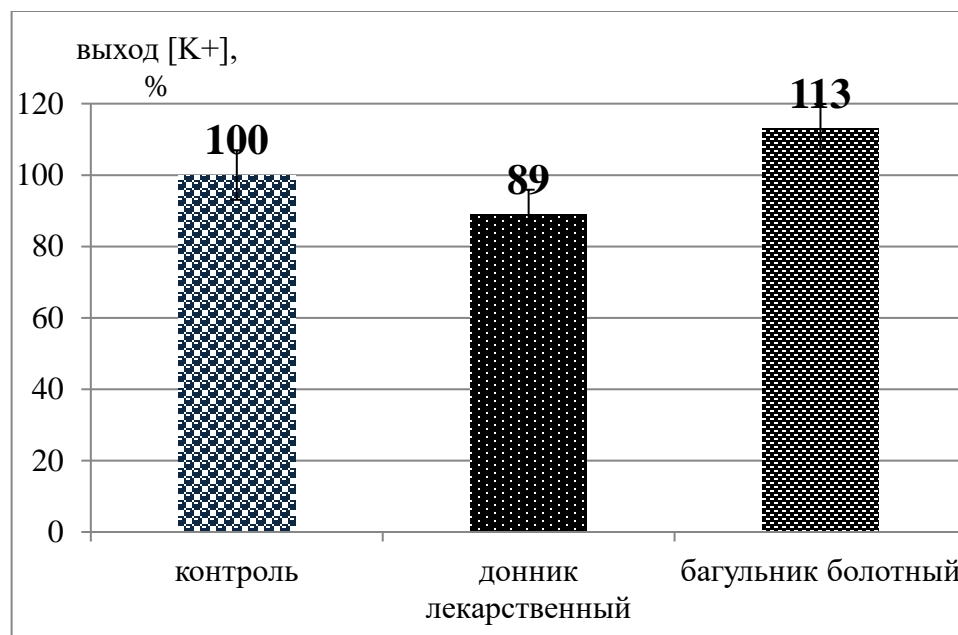


Рисунок 3.5.1 – Выход ионов $[K^+]$ (в%) из дрожжевых клеток, облученных $D=0,4$ кГр, при внесении в систему кумаринов, выделенных из экстрактов лекарственных растений донника и багульника.

Результаты проведенных испытаний по определению радиопротекторной активности кумаринов из лекарственных растений показали, что наибольшей активностью обладает кумарин из донника лекарственного (рис. 3.5.1).

Была проведена оценка радиопротекторной активности кумаринсодержащих экстрактов, поскольку известно, что радиопротекторная активность – это химическая защита от ионизирующего излучения. В нашей работе установлено, что антирадикальными свойствами, но сами кумарины в данном водном экстракте показали практически полное отсутствие радиопротекторных свойств по отношению к дрожжевым клеткам расы Феодосия-7. Это может быть связано с синергизмом: влияние и металлов, и других биологически-активных веществ в экстракте оказывают влияние на протекторную активность, а протекторных свойств по отношению дрожжевым клеткам.

В работах [186, 195] исследуют препараты, в состав которых входят кумарины и другие полифенолы. Но каждое кумаринпроизводное соединение требует отдельного детального исследования. Полученные в данной работе результаты на практике позволяют прогнозировать свойства лекарственных кумаринсодержащих соединений, которые найдут дальнейшее продолжение в исследованиях на мышах, кроликах и других более организованных живых системах.

В нашей работе исследования по оценке антиоксидантных и радиопротекторных свойств химических добавок и экстрактов растений были продолжены на модельных биологических объектах, в качестве которых были выбраны хорошо изученные дрожжи рода *Saccharomyces*.

ГЛАВА 4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК *S. CEREVISIAE* T-985 И *S. CARLSBERGENSIS* В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

4.1 Дрожжи как модельная система для оценки радиопротекторных свойств

В качестве модельных биологических объектов для оценки эффективности антиоксидантных свойств изучаемых экстрактов растений и химических добавок были выбраны дрожжевые клетки *S. cerevisiae* T-985 и *S. carlsbergensis*, которые широко применяются в пищевой промышленности.

4.1.1 Получение устойчивых к пероксиду водорода культур микроорганизмов

В результате последовательных циклов обработки дрожжевых клеток пероксидом водорода, их пересева на чистую среду и культивирования удалось получить устойчивые к высоким концентрациям пероксида водорода культуры дрожжей.

Полученные образцы представляют собой превосходный материал для изучения воздействия высоких концентраций пероксида на дрожжевые культуры. Эти образцы сохраняют способность к жизнедеятельности, размножению и физиологической активности даже при достижении таких концентраций, в то время как природные линии исследуемых видов дрожжей утрачивают жизнеспособность уже при концентрациях выше 0,6 г/л. Это делает концентрацию 0,6 г/л предельной для изучения воздействия перекиси на неподготовленные клетки.

С другой стороны, предполагали, что линия, устойчивая к предельной концентрации пероксида водорода (6 г/л) и адаптированная таким образом к

окислительному стрессу, будет демонстрировать совершенно иные свойства при воздействии экстрактов и радиоактивной обработке.

Введём следующие обозначения полученных линий:

1. Образцы дрожжей, адаптированные к концентрации 0,6 г/л – **Cere1**;
2. Образцы дрожжей, адаптированные к концентрации 6 г/л – **Cere2**;
3. Образцы дрожжей, не подвергшиеся действию пероксида водорода–

контроль;

По результатам, проведенных исследований Горячей И.П. и Саенко Ю. В. [8; 36], можно сделать выводы, что геном клеток, при воздействии на них концентрацией пероксида водорода 0,6 г/л, не претерпевает никаких изменений, влекущих за собой точечные мутации. Однако происходит активация ферментов, отвечающих за антиоксидантную защиту, а также усиливается экспрессия генов, связанных с этими ферментами. В таких ситуациях можно говорить об адаптации микроорганизмов к стрессирующему агенту.

Зачастую, адаптивные свойства у дрожжей изменяются только после 3–4 пересева, приближая их свойства и физиологические характеристики к характеристикам контрольных линий.

Одновременно с этим, были получены линии дрожжей, адаптированные к концентрации пероксида 6 г/л. Методика получения оставалась неизменной: после внесения в культуру нужной концентрации, спустя некоторое время выполнялся пересев, а затем очередное культивирование.

Одной из направлений исследования является сравнение свойств контрольной, адаптированных к 0,6 г/л и 6 г/л линий. Для сравнения может служить оценка выживаемости клеток в суспензиях и их устойчивости к воздействию стрессового агента.

В ходе работы были получены соотношения живых и мертвых клеток в клеточной суспензии в двух условиях: без обработки и после воздействия

пероксидом водорода. Анализ проводили сразу после отбора проб, а также после их предварительной 30-минутной выдержки с пероксидом водорода в концентрациях 0,6 г/л и 6 г/л.

Оценка проводилась непосредственно после отбора клеток из колбы, её результаты представлены в виде диаграмм на рисунке 4.1.1.

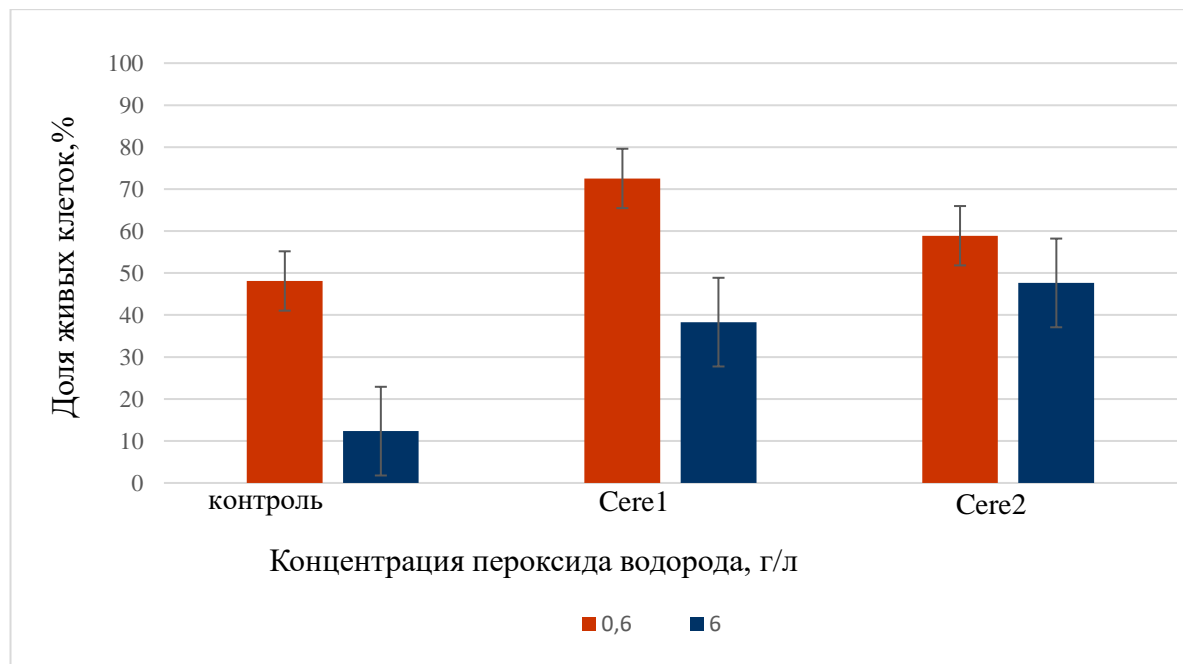


Рисунок 4.1.1 – Сравнение выживаемости клеток дрожжей, адаптированных и неадаптированных к стрессу

Как отображено на диаграмме (рис. 4.1.1), наименьшие показатели выживаемости после внесения стрессового агента относятся к **контролю**, затем, по степени увеличения, идут образцы **Cere2** и, наибольший уровень выживания относится к суспензиям **Cere1**. После внесения 0,6 г/л происходит резкое падение показателей: у **контроля** становится 48,11 (т. е. погибло около 51% клеток, что ожидаемо от неподготовленной культуры), у адаптированных линий **Cere1** и **Cere2** переход не такой резкий – 72 и 58 в концентрации %, соответственно. В результате добавления в колбы 6 г/л пероксида, доля живых клеток у **контроля** составляет 12,34%, у **Cere1** – 38,31%, а у **Cere2** – 47,64%. Наиболее высокие показатели

адаптации и устойчивости к 0, 6 г/л у **Cere1**, а **Cere2** демонстрирует наиболее высокие показатели адаптации и устойчивости к пероксиду водорода, к 6 г/л, что и ожидалось от адаптированной к высоким концентрация линии.

4.1.2 Проверка устойчивости клеток, высеянных на чашках Петри

Следующий эксперимент был посвящен проверки устойчивости клеток, путем посева на чашках Петри. В среду были предварительно добавлены концентрации пероксида водорода: 10 мкл, 30 мкл и 60 мкл. Колонии появились на 4 сутки, изображения колоний можно увидеть на рисунках 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 и 4.1.5.



Рисунок 4.1.2 – Рост колоний *S. cerevisiae* **Cere2** и **Cere1** на твердой среде с содержанием H_2O_2 10 мкл. Общий вид снизу.



Рисунок 4.1.3 – Рост колоний *S. cerevisiae* **Cere2** на твердой среде с содержанием H_2O_2 10 мкл



Рисунок 4.1.4 – Рост колоний *S. cerevisiae* **Cere2** на твердой среде с содержанием H_2O_2 10 мкл

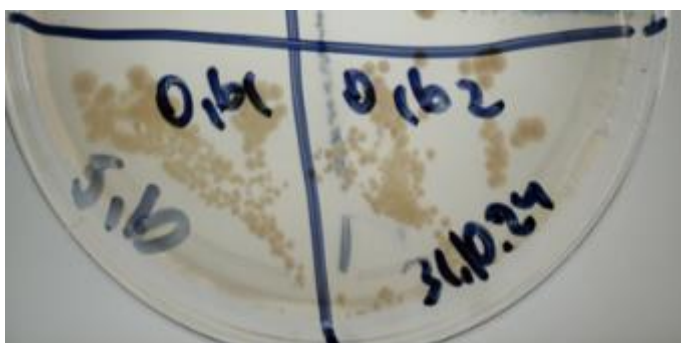


Рисунок 4.1.5 – Рост колоний *S. cerevisiae* **Cere1** на твердой среде с содержанием H_2O_2 10 мкл.

На фотографиях (рис. 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 и 4.1.5) видно, что линии **Cere1** и **Cere2** успешно растут и образуется много колоний при концентрации 10 мкл. Однако при добавлении 30 и 60 мкл пероксида водорода дрожжи уже не развиваются – для данных линий, эти концентрации оказались губительными.

4.1.3 Определение содержания общего белка в биомассе методом Кьельдаля

Для получения точных данных о влиянии разных концентраций пероксида водорода на дрожжи провели биохимические исследования. В ходе этих анализов определяли содержание общего белка в биомассе методом Кьельдаля [196]. Для исследования использовали 5 пассаж.

Для определения количества накопленной биомассы измеряли оптическую плотность с помощью КФК-3.01, длина волны – 540 нм, после чего просчитывали сухой вес. Затем промывали получившийся порошок и использовали для анализа на содержание сырого протеина.

Для определения уровня протеина в биомассе использовался метод Кьельдаля [196 – 198].

Результаты экспериментов с использованием дрожжей *S. cerevisiae* приведены в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1 – Содержание сырого протеина, в зависимости от концентрации пероксида водорода для *S. cerevisiae*

Концентрация пероксида водорода, г/л	Содержание сырого протеина, %
0,6 г/л	49,9 % ± 0, 4%
6 г/л	32,9% ± 0,4%
Контрольный образец	29,9% ± 0, 3

В линиях дрожжей, устойчивых к пероксиду, по результатам эксперимента, видно увеличение содержания сырого протеина. Наибольшее увеличение этого показателя было зафиксировано у линии **Cere1** – на 20 %.

Если сравнить полученные данные с аналогичными. показателями для *S. carlsbergensis* (табл. 4.1.2, рисунок 4.1.6), то можно увидеть, что у *S. cerevisiae* содержание сырого протеина меньше [199].

Таблица 4.1.2 – Содержание сырого протеина, в зависимости от концентрации пероксида водорода для *S. carlsbergensis*

Концентрация пероксида водорода, г/л	Содержание сырого протеина, %
0,6 г/л	60,0 ± 0,2 %
6 г/л	49,5 ± 0,4 %
Контрольный образец	44,2 ± 0,4 %

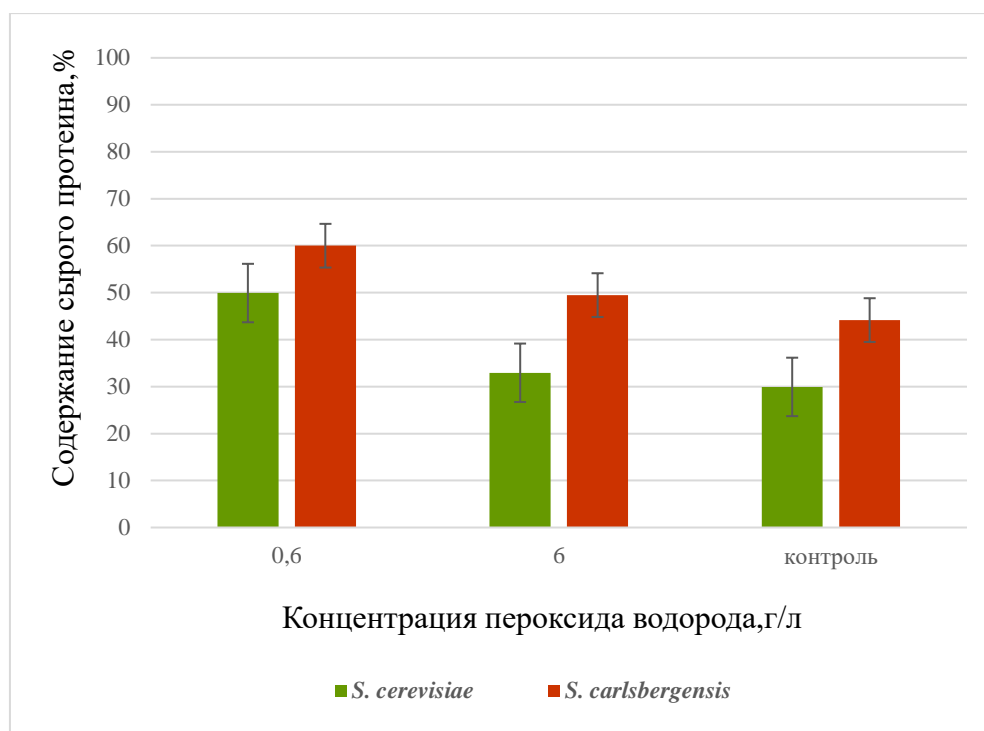


Рисунок 4.1.6 – Сравнение содержание сырого протеина в биомассе адаптированных и неадаптированных вариантов дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*.

Разница между **Carls1** и **Cere1** составляет около 16%, между **Carls1** и **Cere1** – 10,08 %, между контролями – 14%. Таким образом, можно сделать вывод, что адаптированный к пероксиду водорода штамм *S. cerevisiae* содержит в биомассе как минимум на 10 % меньше сырого протеина по сравнению с *S. carlsbergensis*. Это

снижение делает *S. carlsbergensis* более выгодным кандидатом для промышленного использования.

Адаптация клеток к концентрации пероксида водорода (0,6 г/л и 6 г/л) вызывает изменения в метаболизме, что, в свою очередь, приводит к усилению синтеза антиоксидантных ферментов, которые обеспечивают защиту клеток от окислительного стресса. В результате чего увеличивается количество белка внутри клетки. Одновременно с этим, стрессирование вызывает гибель наименее устойчивых к воздействию пероксида водорода и росту генетических мутаций.

Результаты исследования могут быть применены для улучшения методов производства кормового белка, очистки сточных вод или переработки отходов.

4.1.4 Определение содержания нуклеиновых кислот методом Спирина

Для получения точных данных о влиянии разных концентраций пероксида водорода на дрожжи провели биохимические исследования. В ходе этих анализов определяли концентрацию нуклеиновых кислот (НК) методом Спирина [196], в основе которого лежит контролируемое расщепление связи между азотистыми основаниями и сахарофосфатным остовом нуклеиновых кислот. Этот гидролиз инициируется воздействием высокой температуры в среде концентрированной хлорной кислоты ($HClO_4$). Для исследований использовали 5 пассаж.

Для определения концентрации накопленных НК измеряли оптическую плотность с помощью КФК-3.01, длина волны – 270 и 290 нм, после чего просчитывали по формуле (4.1).

Определение содержания НК (мг/мл) проводят по формуле:

$$НК = (D_{270} - D_{290}) \cdot a \quad (4.1)$$

Результаты экспериментов с использованием дрожжей *S. cerevisiae* приведены в таблице 4.1.3.

Таблица 4.1.3 – Содержание нуклеиновых кислот в биомассе, в зависимости от концентрации пероксида водорода для *S. cerevisiae*

Концентрация пероксида водорода, г/л	Содержание нуклеиновых кислот, %
0,6 г/л	7,3% ± 0,3%
6 г/л	7,1% ± 0,4%
Контрольный образец	5,2% ± 0,4%

В линиях дрожжей, устойчивых к пероксиду, по результатам эксперимента, видно увеличение концентрации нуклеиновых кислот. Наибольшее увеличение этого показателя было зафиксировано у линии **Cere1** – 7,3%, что превышает контроль на 2%.

Если сравнить полученные данные с показателями для *S. carlsbergensis* (табл. 4.1.4), то можно увидеть, что у *S. cerevisiae* содержание нуклеиновых кислот больше во всех линиях.

Результаты экспериментов с использованием дрожжей *S. carlsbergensis* приведены в таблице 4.1.4.

Таблица 4.1.4 – Содержание нуклеиновых кислот в биомассе, в зависимости от концентрации пероксида водорода для *S. carlsbergensis*

Концентрация пероксида водорода, г/л	Содержание нуклеиновых кислот, %
0,6 г/л	7,0% ± 0,3%
6 г/л	6,2% ± 0,4%
Контрольный образец	3,5% ± 0,2%

Разница между **Carls2** и **Cere2** составляет около 0,9 %, между **Carls1** и **Cere1** – 0,3 %, между контролями – 1,8 %. Таким образом, можно сделать вывод, что адаптированный к пероксиду водорода штамм *S. cerevisiae* содержит в биомассе как минимум на 0,3 % больше нуклеиновых кислот, по сравнению с *S. carlsbergensis*.

Адаптация дрожжевых клеток к воздействию пероксида водорода влечет за собой сдвиги в метаболизме. Эти изменения стимулируют повышенную выработку антиоксидантных ферментов, выполняющих защитную функцию против окислительного стресса. Как следствие, наблюдается увеличение содержания не только белков, но и нуклеиновых кислот внутри клетки. Более высокий уровень образования нуклеиновых кислот делает *S. cerevisiae* перспективным кандидатом для промышленного использования.

4.1.5 Изучение влияния ионизирующего облучения на выживаемость клеток

В ходе последующих экспериментов было проведено изучение влияния ионизирующего облучения на адаптированные и неадаптированные линии дрожжей *S. cerevisiae* *Meyen T-985* (рис. 4.1.7).



Рисунок 4.1.7 – Подготовленные пробы с суспензиями *S. cerevisiae* для облучения при 400 Гр, 800 Гр, 2000 Гр.

Результаты, описывающие выживаемость клеток при облучении в 400 Гр, 800 Гр, 2000 Гр представлены в таблице 4.1.5 и рисунке 4.1.8–4.1.9.

Таблица 4.1.5 – Результаты выживаемости клеток после облучения

	Доза ионизирующего облучения, Гр								
	400	800	2000	400	800	2000	400	800	2000
3 час а	67,1±0 ,4	61,5±0 ,3	37±0,5	86,9±0 ,4	72,7±0 ,4	65,8±0 ,1	81,3±0 ,2	74,7±0 ,5	55,2±0 ,3
24 час а	60,1±0 ,1	50,7±0 ,3	33,5±0 ,3	78,8±0 ,1	67,±0, 3	54,7±0 ,3	76,7±0 ,2	58,2±0 ,4	51,9±0 ,5
	Контроль			Cere1			Cere2		

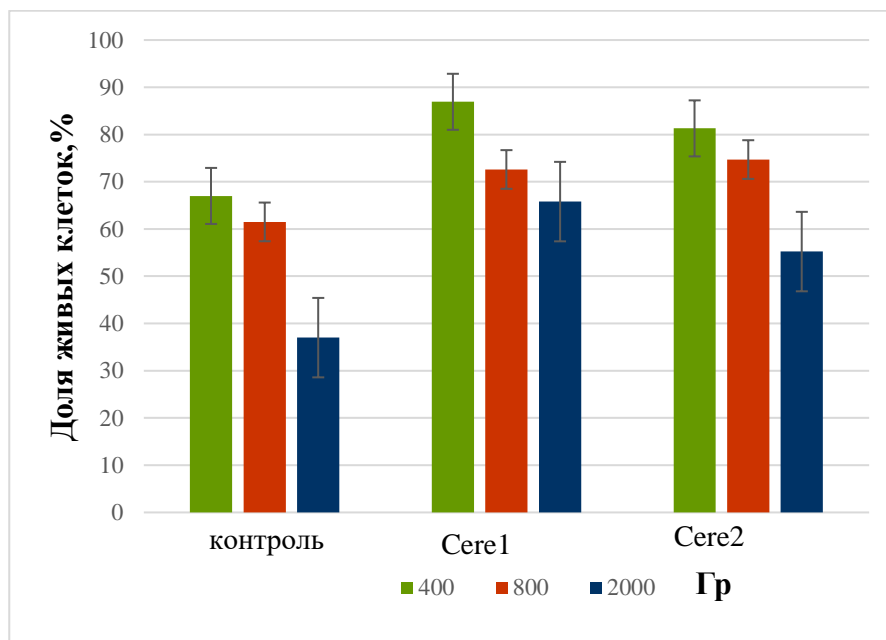


Рисунок 4.1.8 – Результаты сравнения выживаемости клеток дрожжей *S. cerevisiae* Meyen T-985, адаптированных к стрессу и неадаптированных спустя 3 часа после влияния ионизирующего облучения в дозах 400 Гр, 800 Гр и 2000 Гр.

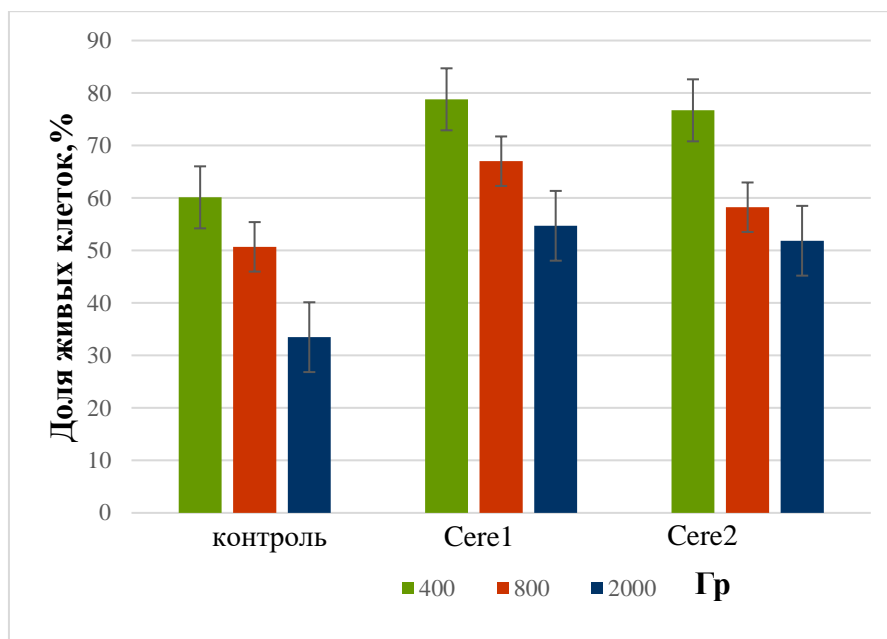


Рисунок 4.1.9 – Результаты сравнения выживаемости клеток дрожжей *S. cerevisiae* Meyen T-985, адаптированных к стрессу и неадаптированных спустя 24 часа после влияния ионизирующего облучения в дозах 400 Гр, 800 Гр и 2000 Гр.

Выживаемость в **контроле**, до облучения, составляла 99 %, но затем, в ходе испытания, данный показатель значительно снижается. Спустя 3 часа, при дозе 400 Гр, выживаемость упала на 35 %, у линии **Cere1** данный показатель упал на 13%, а у **Cere2** на 18 %.

Такое же падение данных мы можем наблюдать и при дозе в 800 Гр, разница количества жизнеспособных клеток между необлученным и облученными линиями составило: **контроль** – 38%, **Cere1** – 27%, **Cere2** – 25%.

По данным из таблицы 4.1.5 видно, что высокие дозы облучения в 2000 Гр лучше переносят адаптированные варианты: разница между **Cere1** и **контроль** составляет 28%, из этого можно сделать вывод, о том, что адаптированный вариант переносит ИИ гораздо лучше, чем тот, который предварительно не адаптировали пероксидом водорода. К тому же общее падение выживаемости при дозе 800 Гр и 2000 Гр у линии **Cere1** носит более плавный характер, отличие между дозами – чуть

больше 7 %, как через 3 часа, так и спустя 24 часа, нежели, чем у **контроля и Cere2**. У **контроля** при увеличении дозы с 800 Гр на 2000 Гр, наблюдается резкое падение, равное 24 % (спустя 3 часа) и 17 % (спустя 24 часа).

Дополнительно, отмечается общее уменьшение выживаемости у клеток спустя 24 часа после облучения, что может быть связано с условиями хранения проб – в неосвещенном пространстве, следовательно, отсутствовала фотореактивация, и это негативно сказалось на жизнеспособности.

Таким образом, можно сделать выводы о том, что ионизирующее облучение при высоких дозах в 400 Гр, 800 Гр и 2000 Гр носит негативный характер и подавляет рост клеток. По-видимому, это объясняется стрессовым воздействием на клетки самих метаболитов, продуктов их окисления, а также компонентов среды. Причем после облучения эти агенты могут проявлять повышенную активность в образовании свободных радикалов.

4.1.6 Влияние дневного света на дрожжи *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

На данном этапе работы изучали влияние дневного света на выживаемость дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* после воздействия на них рентгеновского облучения на установке «Model- КАЛАН 4», расположенной на кафедре ХВЭ РХТУ им. Д.И. Менделеева.

В ходе экспериментов использовали пероксид водорода с концентрацией 0,6 г/л и дрожжи *S. cerevisiae* расы Т-985 Mayen и *S. carlsbergensis* из разных пассажей. По ходу пересевов из колб производился отбор части суспензии (5–10 % об.), которая высевалась на питательную среду с последующим определением показателей роста в условиях освещения.

Таблица 4.1.6 – Облучение дрожжей *S. cerevisiae*

Пробирка (пластиковые)	Объём Без H_2O_2 , мл	Время облучения, с	Дозы, Гр
1	2	10	30
2	2	25	75

Таблица 4.1.7 – Облучение дрожжей *S. cerevisiae*

Пробирка (пластиковые)	Объём без H_2O_2 , мл	Время облучения, с	Дозы, Гр
1	2	0	0
2	2	150	450
3	2	300	900
4	2	600	1800

Таблица 4.1.8 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы сразу после облучения (3-ий пассаж)

Пробирка (пластиковые)	Объём без H_2O_2 , мл	Время облучения, с	Дозы, Гр	Мёртвые клетки %
1	2	0	0	3%
2	2	300	900	15%
3	2	600	1800	17%
4	2	900	2700	23%

Таблица 4.1.9 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы сразу после облучения (3-ий пассаж)

Пробирка (пластиковые)	Объём с H_2O_2 , мл	Время облучения, с	Дозы, Гр	Мёртвые клетки %
1	2	0	0	6%
2	2	300	900	22%
3	2	600	1800	20%
4	2	900	2700	17%

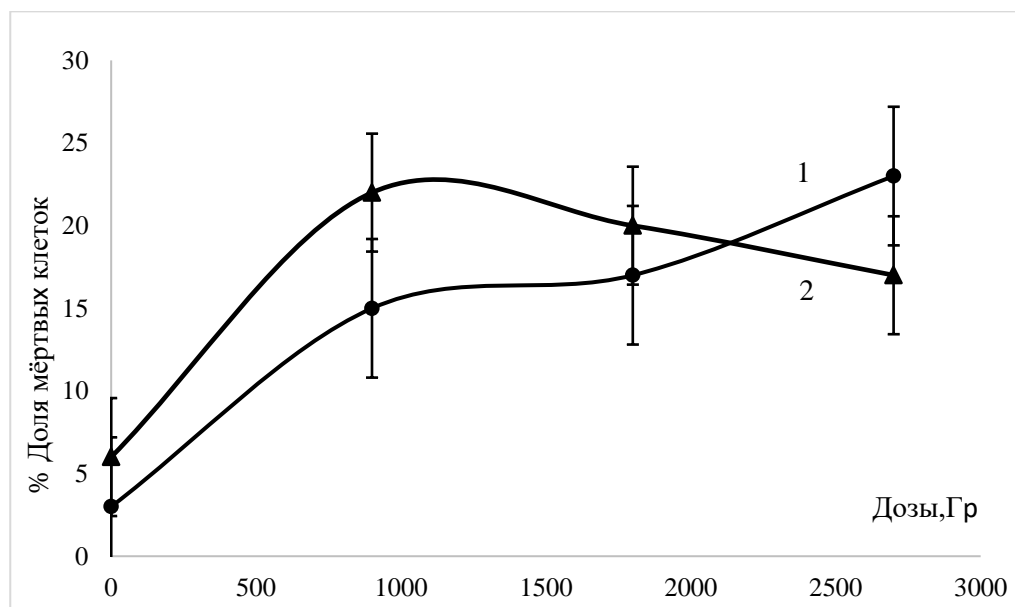


Рисунок 4.1.10 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы облучения на дневном свете сразу после облучения (3-ий пассаж):

1 – контроль, 2 – внесение H_2O_2

Таблица 4.1.10 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы при выдерживании в темноте 3 часа после облучения (3-ий пассаж)

Пробирка (пластиковые)	Объём без H ₂ O ₂ , мл	Время облучения, с	Дозы, Гр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	3%
2	2	300	900	30%
3	2	600	1800	20%
4	2	900	2700	27%

Таблица 4.1.11. – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы при выдерживании в темноту 3 часа после облучения, (3-й пассаж)

Пробирка (пластиковые)	Объём с H ₂ O ₂ , мл	Время облучения, с	Дозы, Гр	Мёртвые клетк
1	2	0	0	6%
2	2	300	900	25%
3	2	600	1800	23%
4	2	900	2700	22%

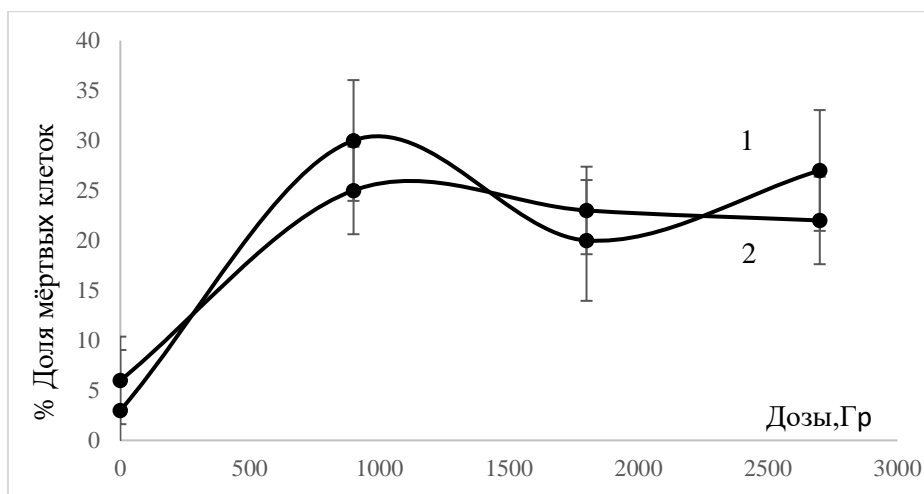


Рисунок 4.1.11 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы облучения при выдерживании в темноте 3 часа после облучения (3-ий пассаж)

1 – контроль, 2 – внесение H_2O_2

Сравнивая значения доли мертвых клеток, полученные после их выдерживания в темноте с данными, которые получены при дневном свете сразу после облучения (рис. 4.1.10), где максимум мёртвых клеток достигал 22%–25%, а потом уменьшался, видно, что в темноте клетки погибают в меньшей степени при тех же дозах облучения. Особенно заметно это при высоких дозах (1800–2700 Гр): при свете гибель сохраняется выше, чем в темноте. Вероятно, под воздействием света происходит активация фотосенсибилизирующих процессов или усиление окислительного стресса, что ведёт к большей гибели клеток. В темноте (рис. 4.1.11) эти процессы подавлены, что позволяет клеткам восстанавливаться в большей степени. Показано, что внесение H_2O_2 увеличивает гибель клеток лишь незначительно по сравнению с контролем. Это указывает на то, что в темноте пероксид водорода не оказывает синергетического эффекта с облучением в такой степени, как на свету. Максимальная степень гибели клеток достигается при 900 Гр, а затем доля мёртвых клеток уменьшается, что вероятно, вероятно связано с включением репарационных процессов у выживших клеток после стресса. Свет после рентгеновского облучения усиливает гибель клеток дрожжей *S. cerevisiae*,

вероятно, за счёт активации фотохимических реакций и повышения окислительного стресса. В темноте наблюдается более умеренная гибель, что может свидетельствовать о репарации ДНК и снижении вторичных повреждений, особенно при высоких дозах. Таким образом, освещение является значимым фактором, влияющим на радиочувствительность дрожжевых клеток.

Таблица 4.1.12 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании на свете 3 часа после облучения (4-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объем контроля, мл	$\tau_{\text{облу}}$, с	Дозы, кГр	Оптически плотность, А, 3 мм кювет	Мертвые%
1	2	0	0	2,6	11
2	2	600	1,8	2,9	23
3	2	900	2,7	2,5	22
4	2	3600	10,8	2,8	95

Таблица 4.1.13 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae*, при выдерживании на свете 3 часа после облучения (4-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объем с H_2O_2 , мл	$\tau_{\text{облу}}$, с	Дозы, кГр	Оптически плотность, А, 3 мм кювет	Мертвые%
1	2	0	0	2,3	13
2	2	600	1,8	2,3	14
3	2	900	2,7	2,4	23
4	2	3600	10,8	1,9	90

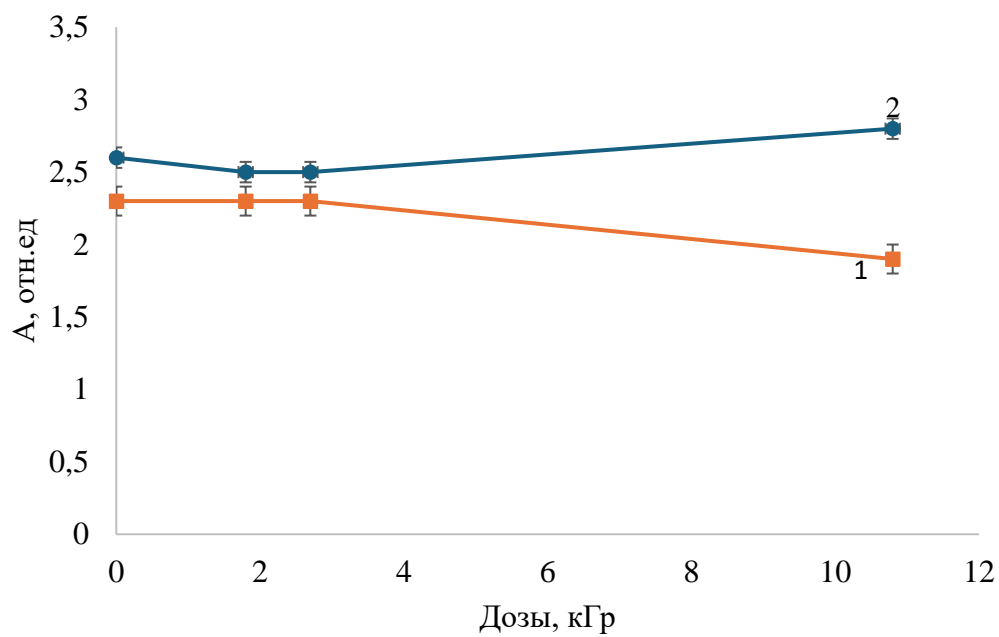


Рисунок 4.1.12 – Зависимость изменения оптической плотности раствора при длине волны 540 нм от дозы облучения (4-ый пассаж): 1– контроль, 2– внесение H_2O_2

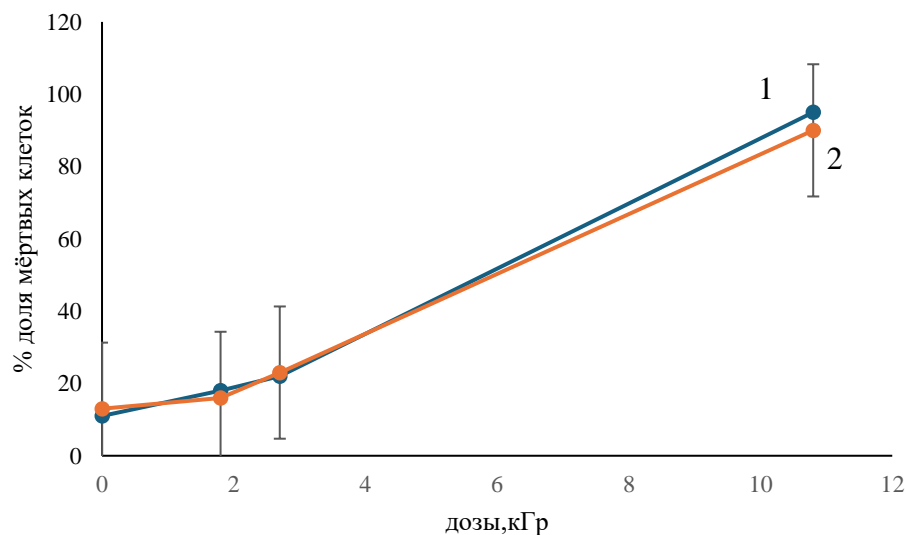


Рисунок 4.1.13 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы при выдерживании на свете 3 часа после облучения (4-ый пассаж):
1– контроль, 2– внесение H_2O_2

Таблица 4.1.14 – Зависимость доли мёртвых клеток при выдерживании в темноте в холодильнике на 3 сутки после облучения (6-ой пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объем контроля, мл	$\tau_{\text{облу, с}}$	Дозы, кГр	Оптически плотность, А, 3 мм кювет	Мертвые%
1	2	0	0	3,4	25%
2	2	600	1,8	3,1	13%
3	2	900	2,7	2,4	16%
4	2	3600	10,8	1,9	81%

Таблица 4.1.15 – Зависимость доли мёртвых клеток при выдерживании в темноте в холодильнике на 3 сутки после облучения (6-ой пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объем H ₂ O ₂ , мл	$\tau_{\text{облу, с}}$	Дозы, кГр	Оптически плотность, А, 3 мм кювет	Мертвые%
1	2	0	0	3,4	38%
2	2	600	1,8	1,4	13%
3	2	900	2,7	2,8	16%
4	2	3600	10,8	2	74%

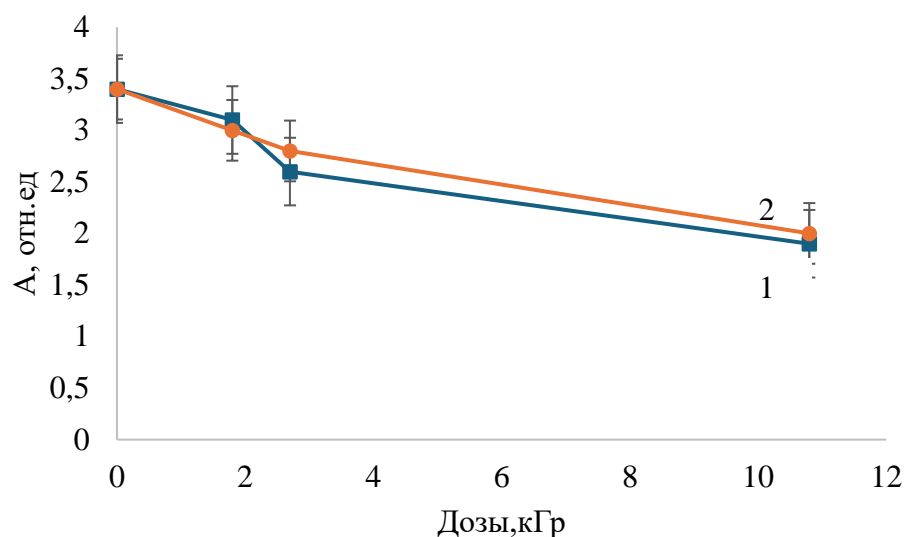


Рисунок 4.1.14 – Зависимость изменения оптической плотности при длине волны 540 нм раствор от дозы облучения при выдерживании в темноте в холодильнике на 3 суток после облучения (6-ой пассаж): 1– контроль, 2– внесение H₂O₂

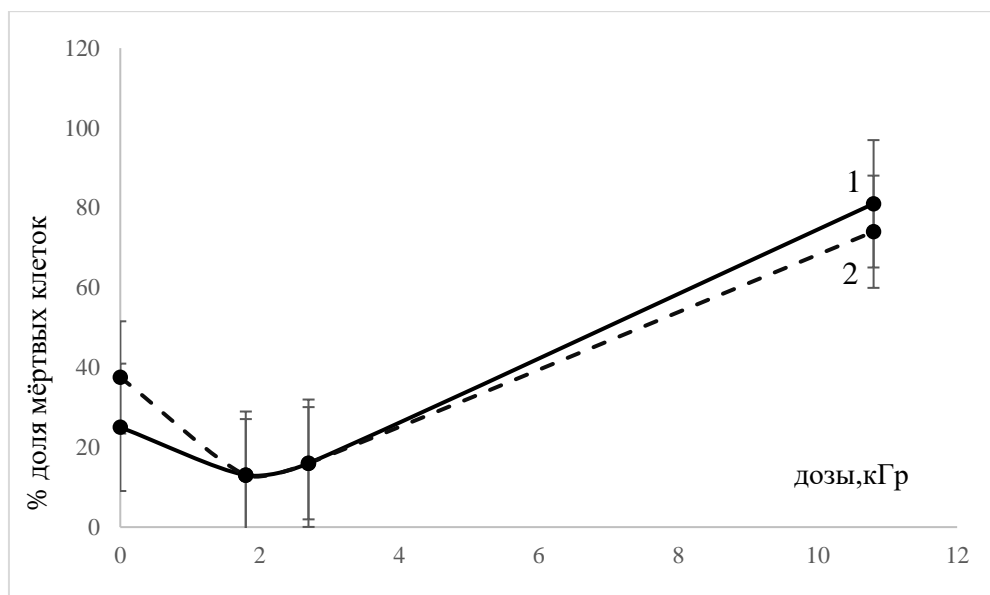


Рисунок 4.1.15 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы при выдерживании в темноте в холодильнике за 3 суток после облучения (6-ой пассаж): 1– контроль, 2– внесение H₂O₂

Таблица 4.1.16 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* сразу после облучения (9-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём контроля, мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	20%
2	2	600	1,8	37%
3	2	1800	5,4	65%
4	2	3600	10,8	90%

Таблица 4.1.17 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* сразу после облучения (9-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём с H ₂ O ₂ , мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	21%
2	2	600	1,8	46%
3	2	1800	5,4	78%
4	2	3600	10,8	83%

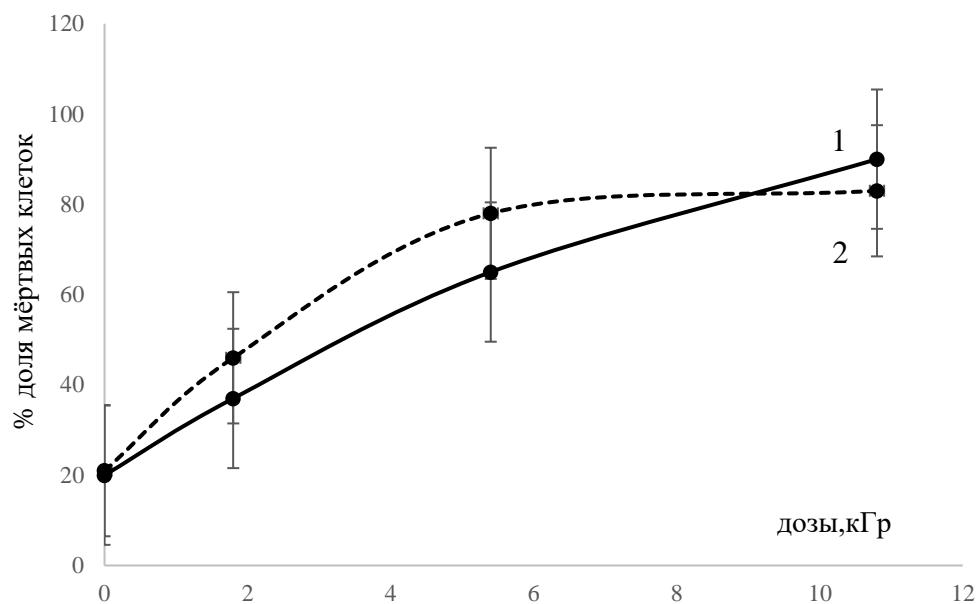


Рисунок 4.1.16 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы сразу после облучения (9-ый пассаж):

1–контроль, 2– внесение H₂O₂

Таблица 4.1.18 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании в холодильнике в темноте одни сутки после облучения (9-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём контроля, мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	28%
2	2	600	1,8	29%
3	2	1800	5,4	79%
4	2	3600	10,8	95%

Таблица 4.1.19 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании в холодильнике в темноте одни сутки после облучения (9-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём с H_2O_2 , мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	17%
2	2	600	1,8	41%
3	2	1800	5,4	66%
4	2	3600	10,8	87%

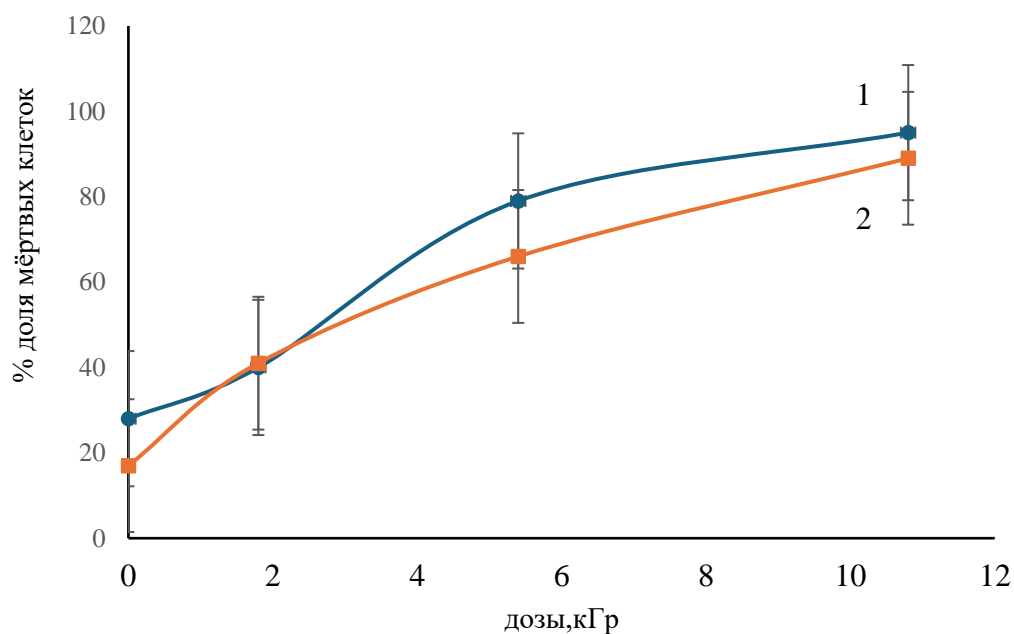


Рисунок 4.1.17 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы при выдерживании в холодильнике в темноте одни сутки после облучения (9-ый пассаж): 1–контроль, 2– внесение H_2O_2

Таблица 4.1.20 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы сразу после облучения (11-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём контроля, мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	23%
2	2	600	1,8	34%
3	2	900	2,7	43%
4	2	3600	10,8	91%

Таблица 4.1.21 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы сразу после облучения (11-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём с H ₂ O ₂ , мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	26%
2	2	600	1,8	31%
3	2	900	2,7	36%
4	2	3600	10,8	92%

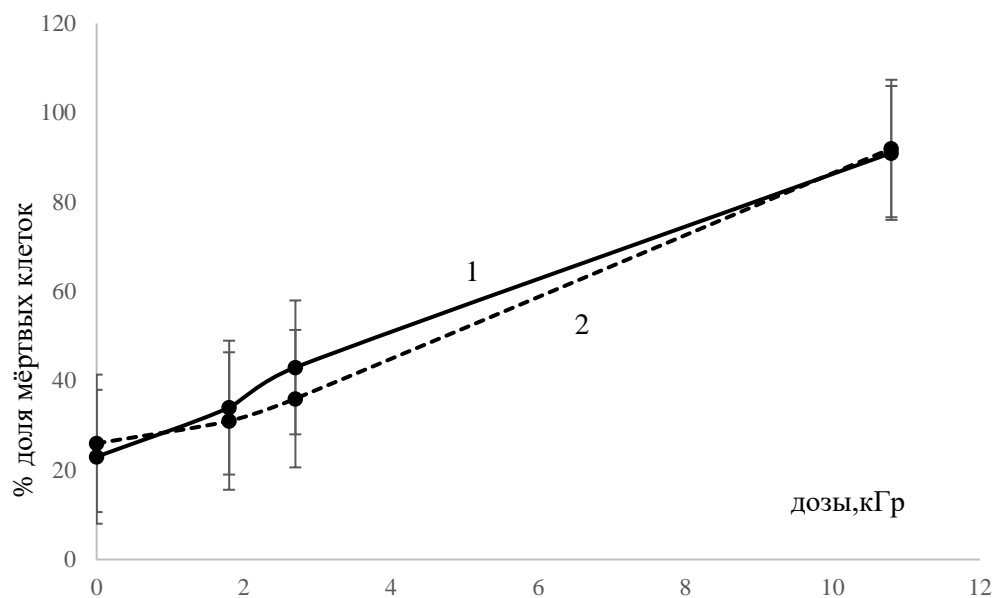


Рисунок 4.1.18 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы сразу после облучения (11-ый пассаж): 1–контроль, 2– внесение H₂O₂

Таблица 4.1.22 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании на дневном свете сутки после облучения (11-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём контроля, мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	15%
2	2	600	1,8	53%
3	2	900	2,7	48%
4	2	3600	10,8	95%

Таблица 4.1.23– Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании на дневном свете сутки после облучения (11-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём с H_2O_2 , мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	30%
2	2	600	1,8	33%
3	2	900	2,7	63%
4	2	3600	10,8	96%

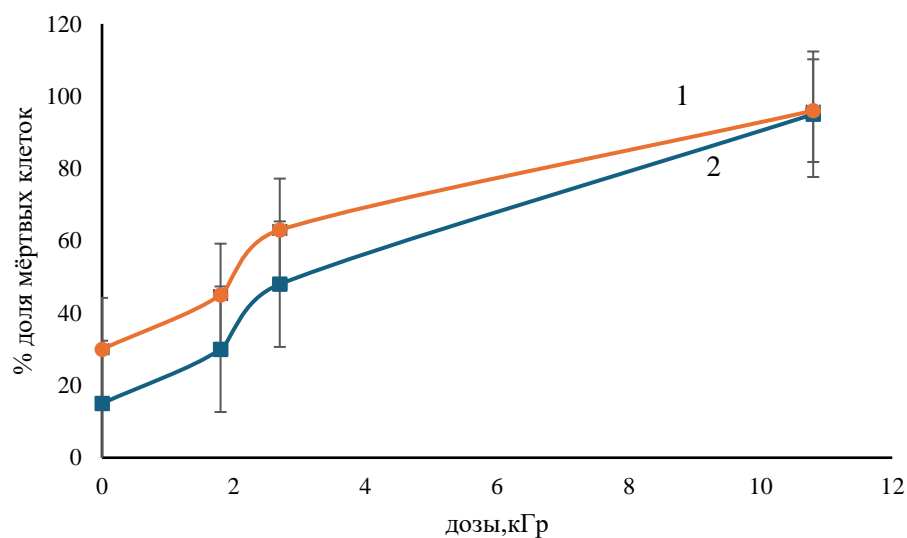


Рисунок 4.1.19 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы облучения при выдерживании на дневном свете сутки после облучения (11-ый пассаж):

1–контроль, 2– внесение H_2O_2

Таблица 4.1.24 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании в холодильнике в темноте сутки после облучения (11-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём контроля, мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	28%
2	2	600	1,8	49%
3	2	900	2,7	52%
4	2	3600	10,8	94%

Таблица 4.1.25 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при выдерживании в холодильнике в темноте сутки после облучения (11-ый пассаж)

Пробирка (Стеклянные)	Объём с H ₂ O ₂ , мл	Время облучения, с	Дозы, кГр	Мёртвые клетки
1	2	0	0	32%
2	2	600	1,8	51%
3	2	900	2,7	41%
4	2	3600	10,8	98%

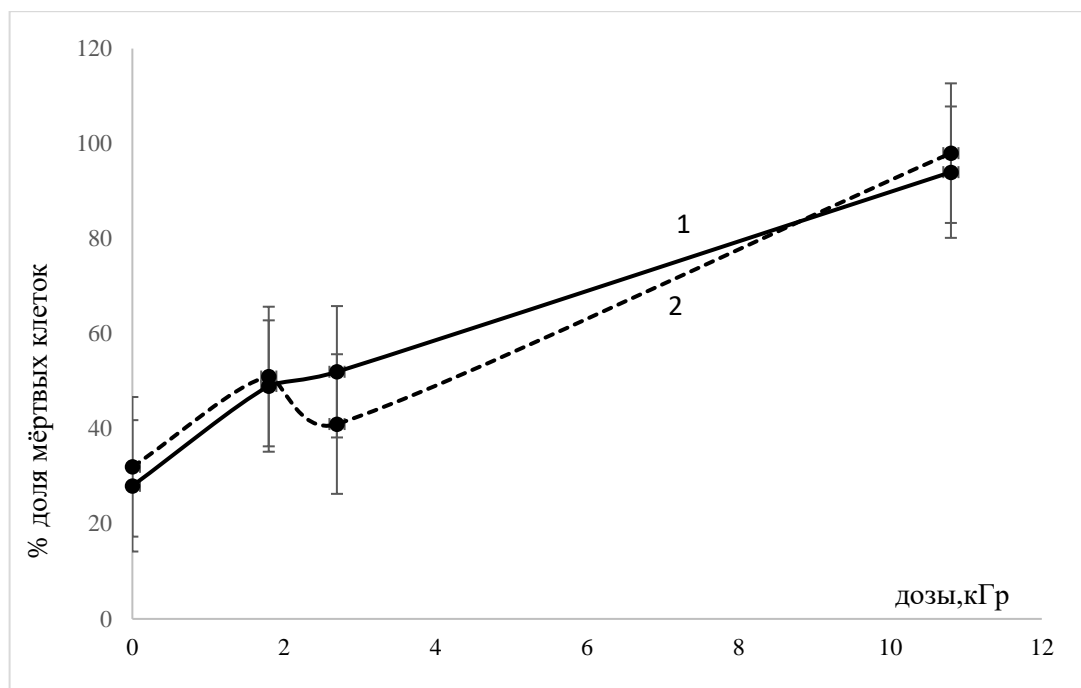


Рисунок 4.1.20 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы облучения при выдерживании в холодильнике в темноте сутки после облучения (11-ый пассаж):

1– контроль, 2– внесение H₂O₂

Было отмечено, что в стеклянных пробирках наблюдается значительно более высокая доля мёртвых клеток, чем в пластиковых, при тех же условиях облучения. Это, скорее всего, может быть связано с большей проницаемостью стекла для рентгеновских лучей и генерацией вторичных радиационных эффектов. В пластиковых пробирках добавление H₂O₂ сначала увеличивает гибель клеток, но затем эффект снижается (возможно, происходит адаптация или расщепление H₂O₂). В стеклянных пробирках добавление H₂O₂ также увеличивает гибель клеток, но эффект более стабильный и достигает плато (~78%), что говорит о возможном синергизме действия H₂O₂ и радиации на клетки. Показано, что в стеклянных пробирках радиационное воздействие и токсичность H₂O₂ выражены сильнее, чем в пластиковых. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что стеклянные пробирки обеспечивают более высокую проницаемость для рентгеновских лучей и,

как следствие, более высокую гибель дрожжевых клеток при рентгеновском облучении, особенно при добавлении H_2O_2 , чем пластиковые. Это подчёркивает важность выбора материала пробирок в экспериментах, связанных с оценкой влияния радиации и окислительного стресса.

4.1.7 Исследование влияния активных форм кислорода (H_2O_2) на выживаемость дрожжей после облучения

На данном этапе выполнения работы была проведена оценка влияния добавок пероксида водорода на рост и жизнеспособность клеток дрожжей в пострadiaционный период, а также влияние видимого света на рост и жизнеспособность дрожжей.

В таблице 4.1.26 представлены результаты экспериментов по изменению оптической плотности дрожжевых суспензий при внесении H_2O_2 на свету после воздействия ионизирующего излучения на клетки дрожжей *S. cerevisiae* шт. Т 985 и *S. carlsbergensis* различных пассажей.

Таблица 4.1.26 – Изменение оптической плотности суспензий *S. cerevisiae* шт. Т 985 в аэробных условиях при внесении H_2O_2 на свету после облучения по мере увеличения количества пассажиров

Номер пассажира	τ (сутки)	Absorbance (опт. плотность), контроль		Опт. плотность при введении H_2O_2	
		50 об/мин	150 об/мин	50 об/мин	150 об/мин
1	1	0,25	0,55	0,15	0,13
2	5	1,50	2,70	0,65	2,60
3	2	0,80	2,15	0	2,25
4	2	0,75	2,50	0	2,60
5	3	0,95	2,10	1,50	2,50
6	1	0,40	1,90	0,33	1,85
7	3	0,70	2,30	0,75	2,40
8	3	0,65	3,15	0,15	2,15
9	2	0,10	2,50	0	1,90
10	2	0,75	2,45	2,25	2,20

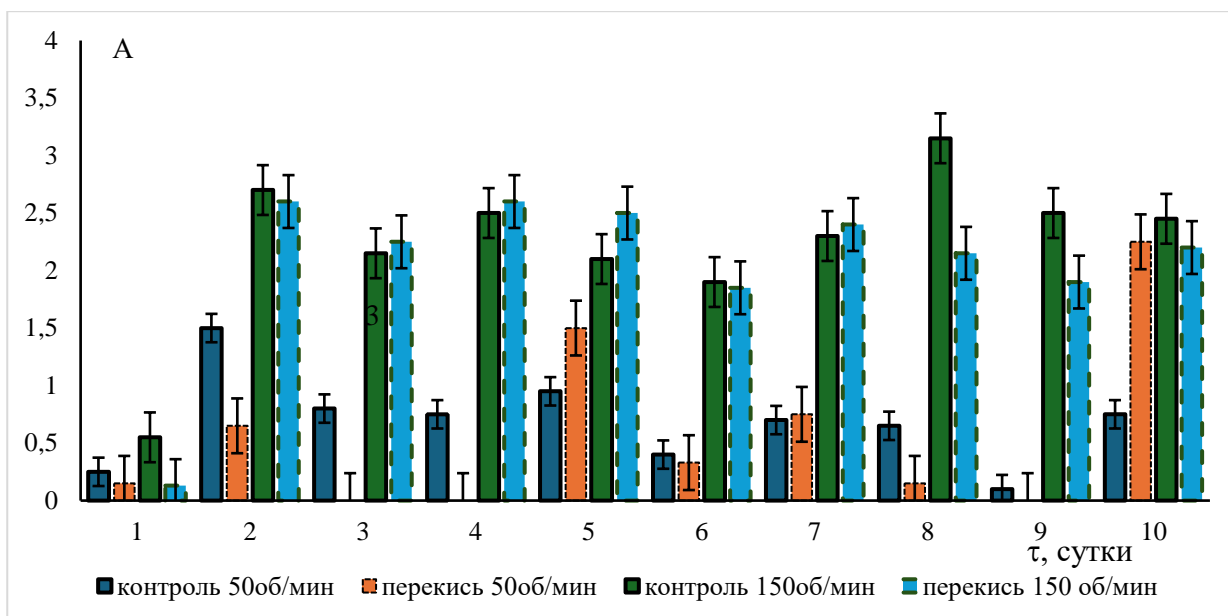


Рисунок 4.1.21 – Изменение оптической плотности суспензии *S. cerevisiae* шт. Т 985 по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 на свету в аэробных условиях: 1– контроль 50 об/мин, 2– контроль 150 об/мин, 3– введение H_2O_2 50 об/мин ,4– введение H_2O_2 150 об/мин

Таблица 4.1.27 – Изменение оптической плотности суспензии *S. cerevisiae* шт. Т 985 в аэробных условиях по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 в темноте

Номер пассажира	τ (сутки)	Опт. плотность, контроль		Опт. плотность при введении H_2O_2	
		50 об/мин	150 об/мин	50 об/мин	150об/мин
1	2/1	1,29	1,88	1,24	1,88
2	5	1,72	2,56	1,74	2,66
3	2	1,38	2,20	1,38	2,20
4	1	1,30	2,13	0,29	2,04
5	5	1,97	2,39	1,98	2,18
6	2	1,44	1,99	1,59	2,06
7	3	1,70	2,31	1,54	2,37
8	2	1,48	2,09	1,13	2,05
9	2	1,66	2,44	0,41	2,41
10	4	1,70	2,39	1,71	2,31

Таблица 4.1.28 – Значение рН суспензии *S. cerevisiae* шт. Т 985 в аэробных условиях по мере увеличения количества пассажей при внесении H_2O_2 на свету

Номер пассажа	Значение рН (контроль)		Значение рН при введении H_2O_2	
	50 об/мин	150 об/мин	50 об/мин	150 об/мин
1	3,05	2,55	3,21	2,61
2	2,78	2,54	2,88	2,45
3	2,83	2,47	3,13	2,40
4	3,04	2,32	5,79	2,41
5	2,57	2,40	2,58	2,59
6	2,93	2,54	2,95	2,50
7	2,67	2,44	2,84	2,42
8	2,88	2,50	3,43	2,55
9	2,71	2,40	4,72	2,43
10	2,65	2,35	3,09	2,62

Значение рН влияет на систему транспорта питательных веществ, степень диссоциации компонентов среды, дисперсность, пространственную организацию и активность ферментных белков, а также на флокуляцию дрожжей. Оптимальным значением рН для размножения клеток дрожжей является 4,8, так как при этом значении рН фермент, переносящий мальтозу в клетку - мальтоспермеаза - обладает максимальной активностью. При более низких значениях рН потребление аминного азота. При подкислении среды заряд клетки уменьшается, и происходит снижение взаимного отталкивания клеток и усиливается флокуляция. В целом дрожжи живут и размножаются в широком диапазоне рН от 2 до 6. Однако резкие колебания этого параметра могут также влиять на активность ферментов, нарушать

биосинтетическую деятельность дрожжей и увеличивать количество мертвых клеток [43].

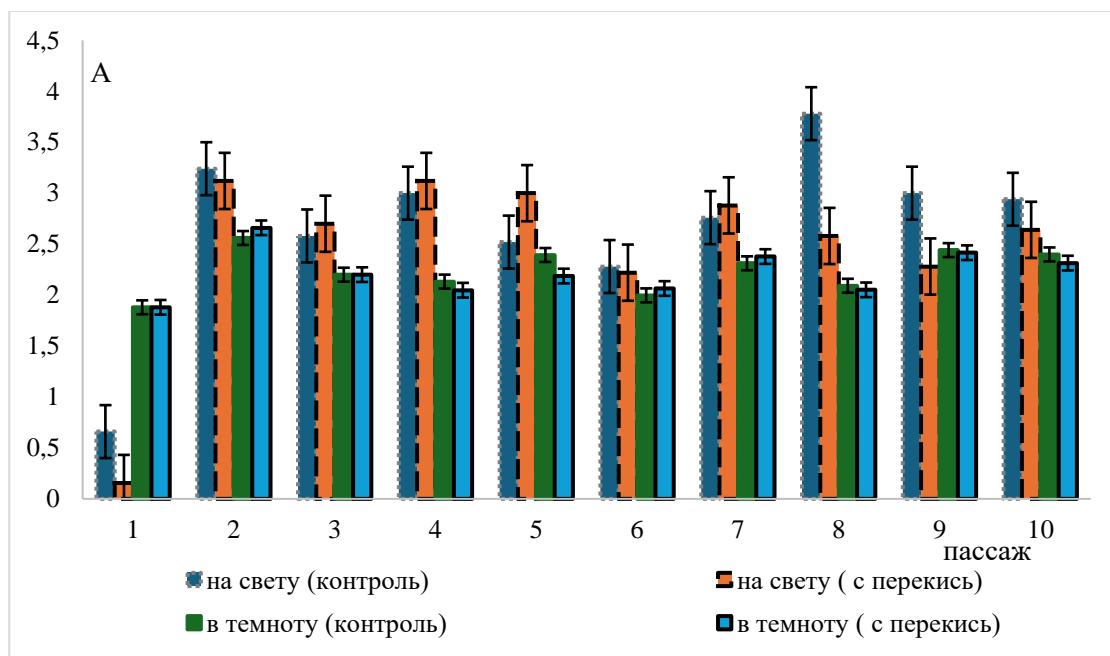


Рисунок 4.1.22 – Изменение оптической плотности раствора от пассажа *S. cerevisiae* шт. Т 985 в аэробных условиях по мере увеличения количества пассажей при внесении H₂O₂ на свету и темноту (150 об/мин)

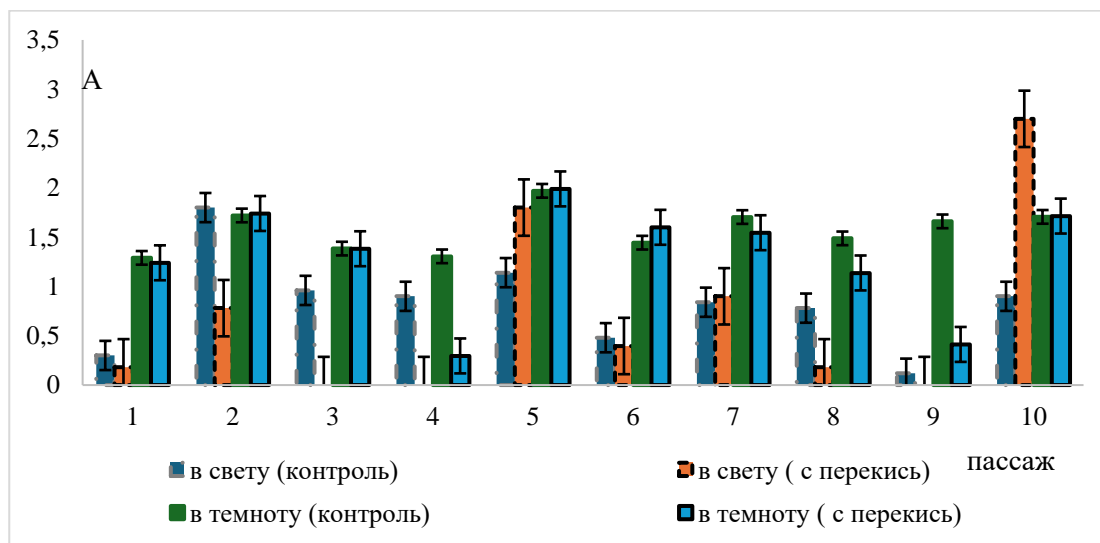


Рисунок 4.1.23 – Оптическая плотность раствора от пассажа *S. cerevisiae* шт. Т 985 в аэробных условиях по мере увеличения количества пассажей при внесении H₂O₂ на свету и темноту (50 об/мин)

Рисунки 4.1.22. и 4.1.23 иллюстрируют изменение оптической плотности суспензии клеток дрожжей от пассажа влияние дозы рентгеновского облучения суспензии клеток дрожжей и фактора освещения на выживаемость клеток по мере их пассирования к окислительному стрессу путем введения пероксида водорода. Показано, что при хранении суспензии клеток дрожжей в темноте зависимость оптической плотности от пассирования практически не изменяется после введения пероксида водорода. Установлен рост оптической плотности в случае контроля после 7 пассажа при освещении видимым светом, рост дрожжей увеличивается, а после введения пероксида на 7 этапе пассирования показано уменьшение роста дрожжевых клеток и значение оптической плотности практически такое же, как и для суспензии клеток дрожжей, которые хранили в темноте.

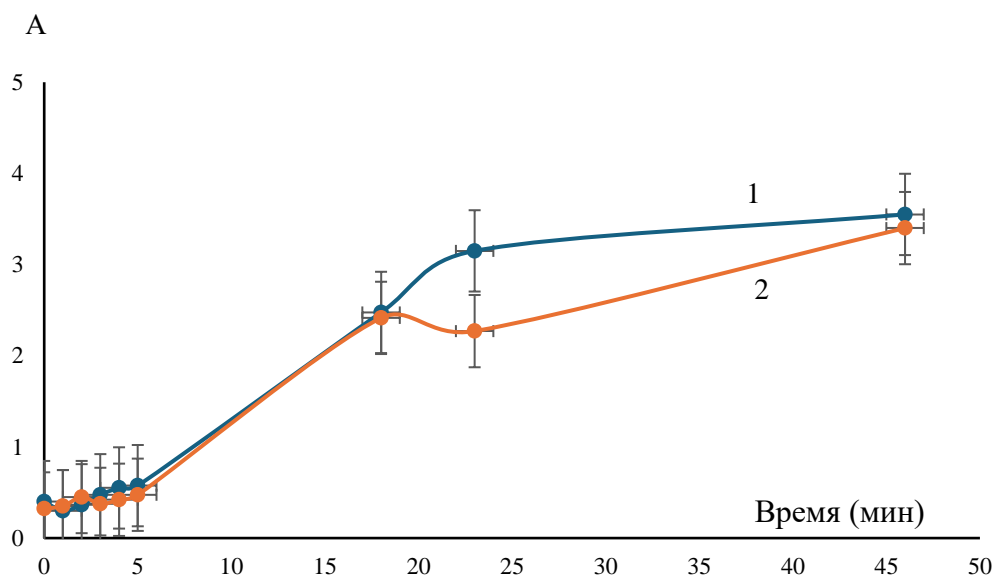


Рисунок 4.1.24 – Рост дрожжей *S. cerevisiae* шт. Т 985 на свету после замораживания-оттаивания посевного материала. 1– *S. cerevisiae*, 2– наличие H₂O₂

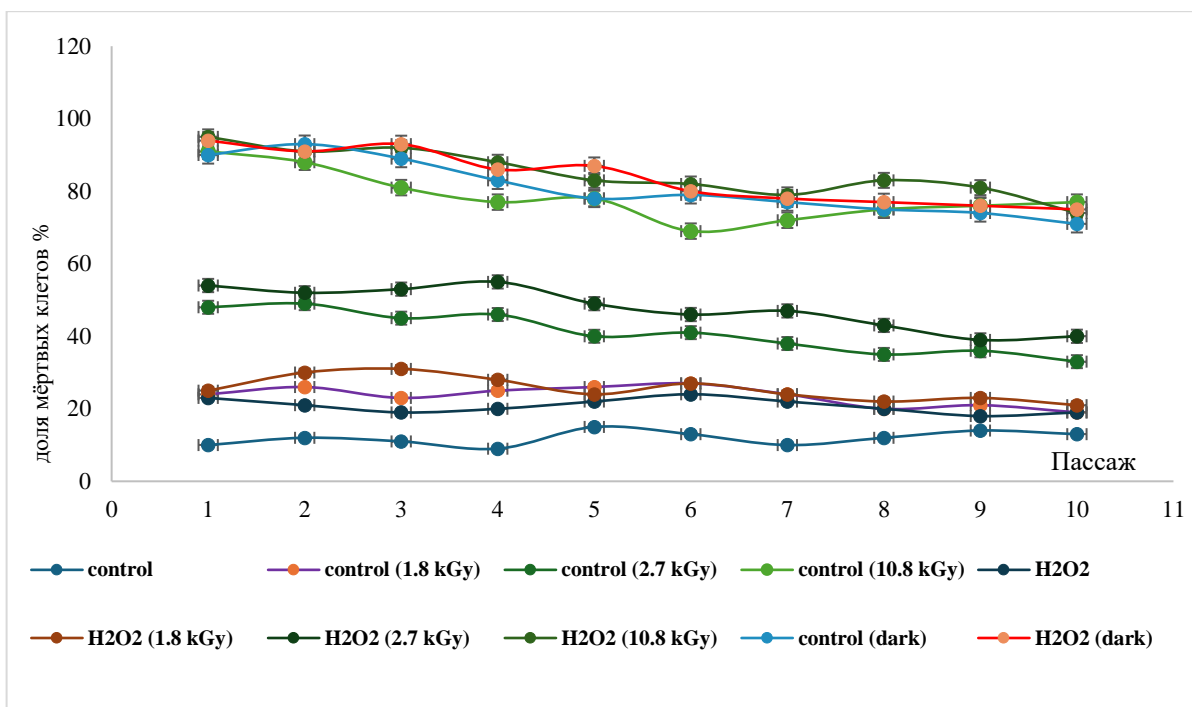


Рисунок 4.1.25 – Изменение доли мертвых клеток в пассажах *S. cerevisiae* шт. Т 985 по мере их адаптации к оптимальным дозам перекиси водорода при различных дозах рентгеновского облучения и их последующем культивировании при дневном свете и в темноте.

Культивирование проводили в качалочных колбах в аэробных условиях с начальной концентрацией субстрата 30 г/л. Долю погибших клеток измеряли через 3 часа после воздействия пероксида. Как следует из данных, приведенных на рис. 4.1.25, действие рентгеновских лучей аналогично действию перекиси водорода, в то время как фактор освещения имеет решающее значение для адаптации клеток. Доля мертвых клеток, подвергшихся воздействию той же дозы перекиси или рентгеновского излучения и находящимся в темноте, составляет около 90% и 85% соответственно для 1-го пассажа. Без освещения уровень остается высоким к 10-му пассажиру: примерно 77% при воздействии пероксида и 74% при воздействии рентгеновского излучения. При культивировании на свету доля мертвых клеток снижается до уровня контроля к 6-му пассажиру. В то же время добавление H_2O_2 ,

контроль (темный) и контрольная доза (10,8 кГр) существенно не влияют на выживаемость и скорость адаптации клеток. Таким образом показано, что рентгеновского облучения в дозе до 2,7 кГр достаточно для восстановления жизнеспособности клеток. Свет в данном случае действует как антистрессор, помогая дрожжевым клеткам преодолевать последствия окислительного стресса, вероятно, посредством механизма фоторепарации.

4.1.8 Влияние окислительного стресса на дрожжи *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

В данном разделе представлены экспериментальные данные по выживаемости дрожжевых клеток после различных доз облучения при внесении в суспензию перекиси водорода 6 г/л.

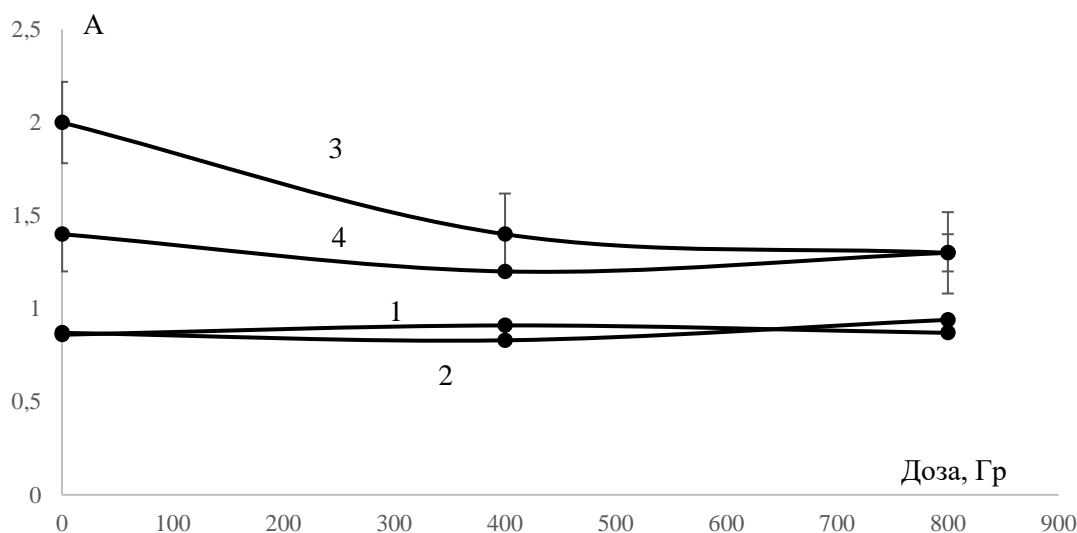


Рисунок 4.1.26 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей от дозы радиации в присутствии H₂O₂: 1 – *S. cerevisiae* (контроль), 2 – *S. cerevisiae* (H₂O₂), 3 – *S. carlsbergensis* (контроль), 4 – *S. carlsbergensis* (H₂O₂)

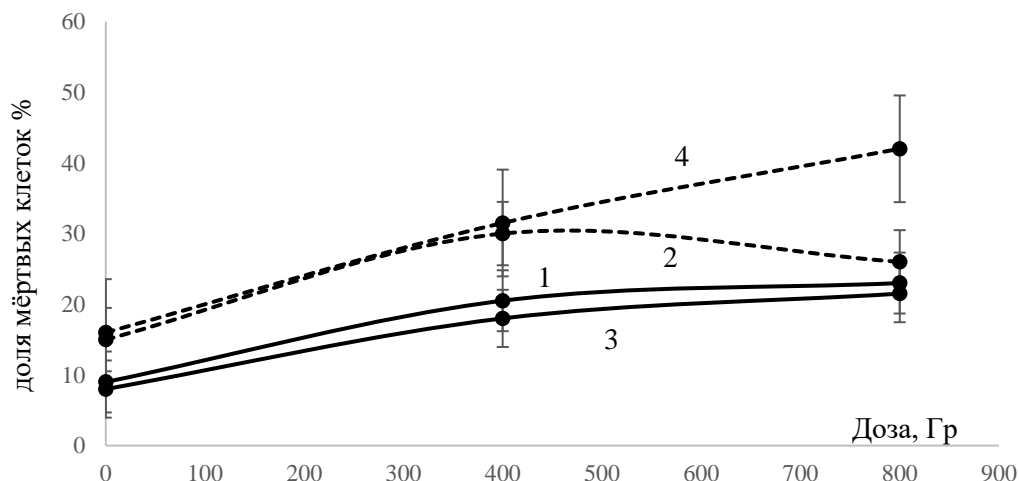


Рисунок 4.1.27 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей в присутствии H₂O₂:1 – *S. cerevisiae* (контроль), 2 – *S. cerevisiae* (H₂O₂), 3 – *S. carlsbergensis* (контроль), 4 – *S. carlsbergensis* (H₂O₂)

4.1.9 Влияние этанола на дрожжи *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

В данном разделе представлены экспериментальные данные по выживаемости дрожжевых клеток после различных доз облучения при внесении в суспензию клеток этанола. в количестве 15 г/л.

Таблица 4.1.29 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	17	26	34
EtOH($5 \cdot 10^{-4}$ М)	30	32	44
Через 24 часа			
Контроль	28	38	40
EtOH($5 \cdot 10^{-4}$ М)	31	33	50

Таблица 4.1.30 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	30 %	32 %	44 %
EtOH($5 \cdot 10^{-4}$ М)	30 %	32,5 %	50 %
Через 24 часа			
Контроль	27 %	38 %	40 %
EtOH($5 \cdot 10^{-4}$ М)	18 %	25 %	31 %

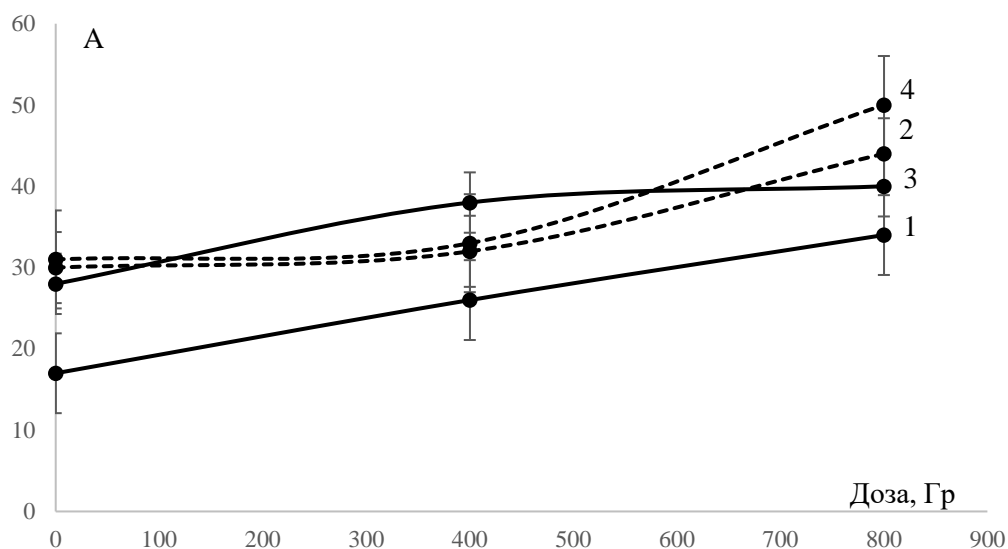


Рисунок 4.1.28 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей от дозы радиации в присутствии этанола: 1 – *S. cerevisiae* (контроль), 2 – *S. cerevisiae* (этанол), 3 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (контроль), 4 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (этанол)

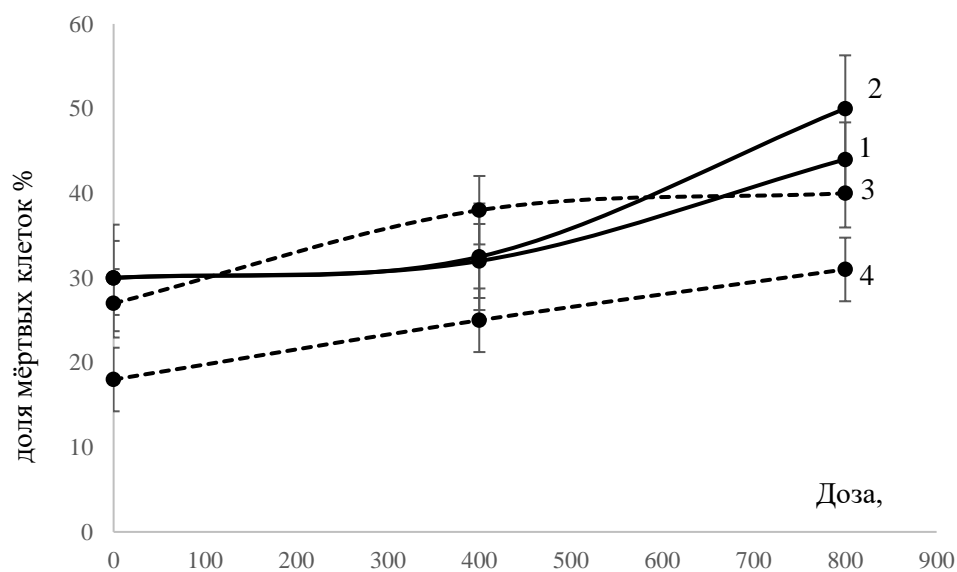


Рисунок 4.1.29 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей в присутствии этанола: 1 – *S. cerevisiae* (контроль), 2 – *S. cerevisiae* (этанол), 3 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (контроль), 4 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (этанол)

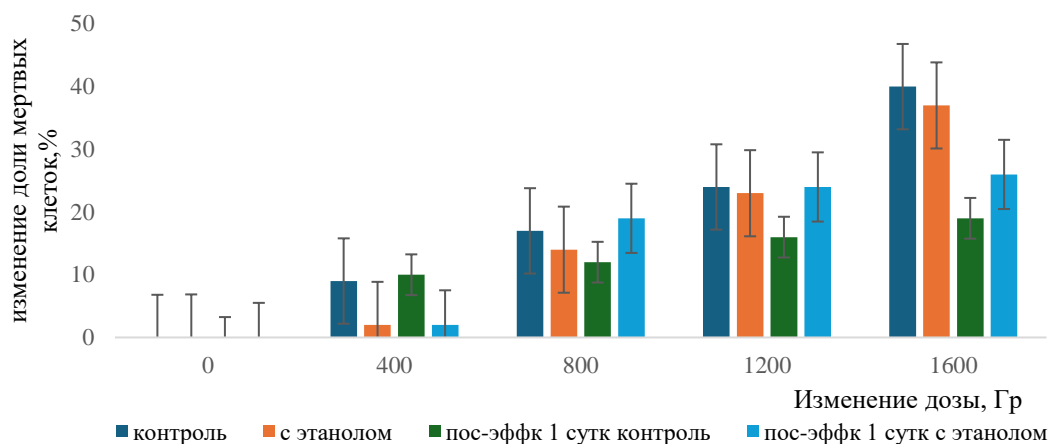


Рисунок 4.1.30 – Изменения доли мёртвых дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в зависимости от дозы и времени после облучения (измерения непосредственно после облучения и через сутки). 1– контроль, 2 – с этанолом, 3 – контроль через 24 часа после облучения, 4 – с этанолом через 24 часа после облучения.

Показано, что воздействие ионизирующего излучения до дозы 150 Гр не влияет на жизнеспособность дрожжевых клеток. При дозах выше 150 Гр зарегистрировано инактивирование дрожжевых клеток с постепенным увеличением доли мертвых клеток при повышении дозы облучения. Добавление этанола к культуре *S. cerevisiae* шт. Т-985 в количестве 15 г/л в фазе экспоненциального роста с последующим отбором аликвот дрожжевой суспензии в конце роста в стеклянные пробирки и их облучением через 30 минут после отбора в дозах 400 Гр, 800 Гр, 1200 Гр, 1600 Гр и выдерживании облученной суспензии на свету приводило к увеличению доли мертвых клеток в 1,5-2 раза и по мере возрастания дозы облучения. Доли мёртвых клеток в пост-радиационный период (при облучении от 400 Гр до 800 Гр) мало отличались (в пределах нескольких %) от доли клеток, измеренной непосредственно после облучения как для варианта с

внесением этанола, так и без его внесения. Полученные результаты свидетельствуют, что:

- дрожжевые клетки с внесением этанола в использованных концентрациях менее устойчивы к облучению по сравнению с контролем;
- существенных изменений в доле живых клеток не наблюдается в пост-радиационный период по сравнению с измерением, проведенным непосредственно после облучения, т.е. фактор времени измерения, прошедшего после облучения, менее существенен по сравнению с другими факторами [199].

4.2 Исследование влияния различных химических факторов на дрожжи *Saccharomyces*

На данном этапе исследования стояла задача по оценке жизнеспособности клеток дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* до и после облучения при воздействии на них различных антистрессорных защитных химических реагентов как при отдельном, так и при совместном внесении.

4.2.1 Влияние нафталина и 2,3-диаминонафталина на выживаемость дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* до и после облучения

На рост и жизнеспособность клеток влияют различные добавки. Известно, что одним из таких антиоксидантов является нафталин и некоторые его производные [102].

В наших исследованиях было проверено влияние эффективности внесения водного раствора нафталина в суспензию клеток *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*.

Эксперименты по оценке защитного действия *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* от окислительного стресса в результате воздействия включает выращивание

культуры дрожжей в стандартных условиях до конца логарифмической или начала стационарной фазы роста и последующую инкубацию с защитным агентом. Защитное средство представлено ингибитором - нафталином в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М. Время инкубации с защитным средством составляло 24–48 часов. Рост дрожжей увеличивается при внесении нафталина в культивируемую среду (рис. 4.2.1, кривая 3 и кривая 4).

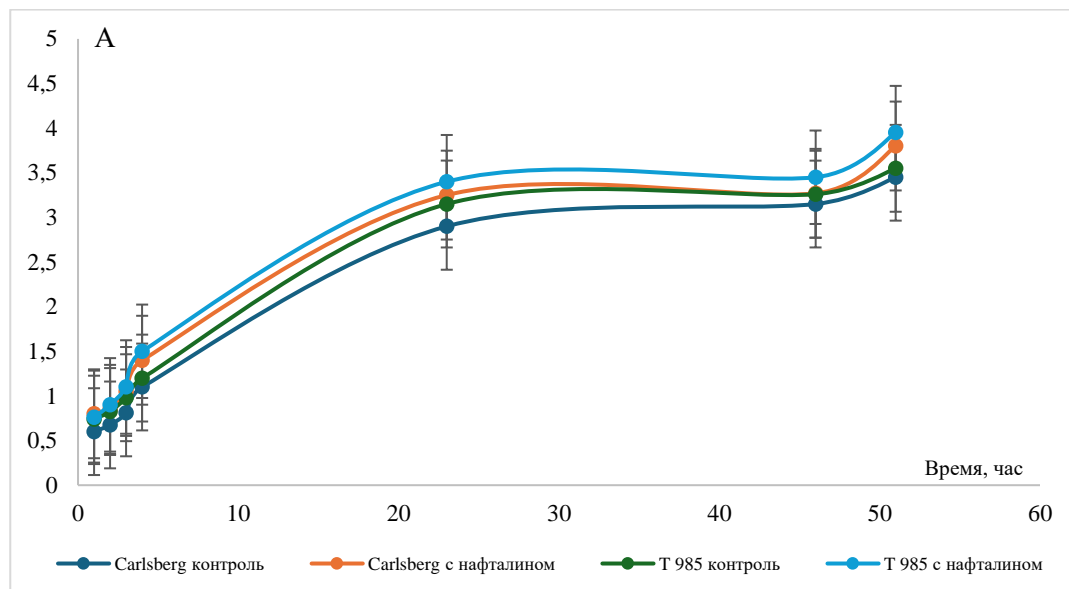
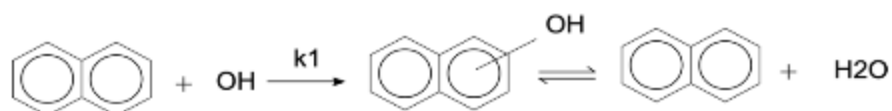
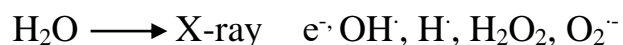


Рисунок 4.2.1 – Динамика роста дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* от времени культивирования; 1– *S. carlsbergensis* (контроль), 2– *S. cerevisiae* (контроль), 3– *S. carlsbergensis* (с $C_{10}H_8$), 4– *S. cerevisiae* (с $C_{10}H_8$)

Полученные культуры дрожжей были подвергнуты облучению дозой 400 Гр и 800 Гр. На рисунках 4.2.2 и 4.2.3 представлено изменение доли мертвых клеток *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* после воздействия на них облучения поглощенной дозой 400 Гр и 800 Гр в присутствии и отсутствии нафталина. Показано, что дрожжевые клетки чувствительны к действию облучения, количество мертвых клеток практически линейно увеличивается с увеличением дозы облучения.

Известно, что при радиолизе нафталина образуются продукты гидроксирования нафталина, что возможно будет проявляться в усилении протекторных свойств по отношению к дрожжевым клеткам. Константа взаимодействия нафталина с ОН составляет ($k_1=5 \times 10^9$ л/М·с) [198].



Дрожжи вида *S. cerevisiae*:

Таблица 4.2.1 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* спустя 3 часа после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Контроль	0,87	0,91	0,96
$\text{C}_{10}\text{H}_8(5 \cdot 10^{-4}\text{M})$	0,91	1,09	1,04

Таблица 4.2.2 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* спустя 3 часа после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Контроль	10 %	28 %	26,4 %
$\text{C}_{10}\text{H}_8(5 \cdot 10^{-4}\text{M})$	7 %	15 %	14 %

Дрожжи вида *S. carlsbergensis*:

Таблица 4.2.3 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* спустя 3 часа после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Контроль	1,45	1,36	1,28
$\text{C}_{10}\text{H}_8(5 \cdot 10^{-4}\text{M})$	0,96	0,99	1,12

Таблица 4.2.4 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* спустя 3 часа после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Контроль	12 %	27 %	24 %
$C_{10}H_8$ ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	10 %	17,5 %	19 %

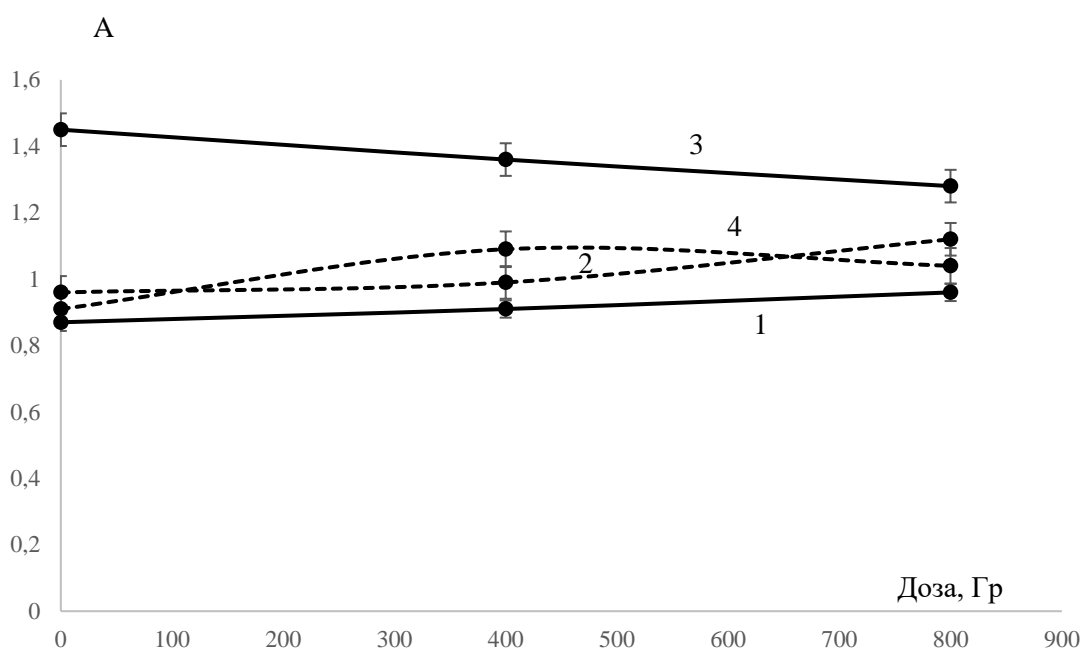


Рисунок 4.2.2 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей от дозы радиации в присутствии нафталина: 1 – *S. cerevisiae* (контроль), 2 – *S. cerevisiae* (с $C_{10}H_8$), 3 – *S. carlsbergensis* (контроль), 4 – *S. carlsbergensis* (с $C_{10}H_8$)

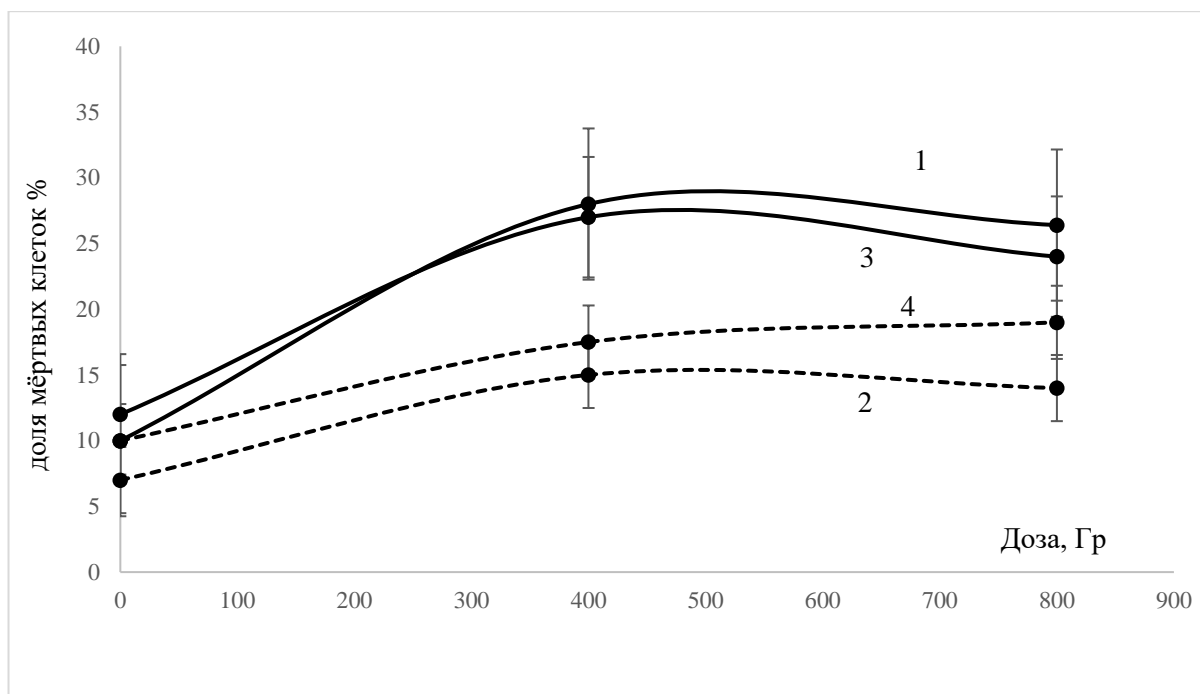


Рисунок 4.2.3 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей в присутствии: 1 – *S. cerevisiae* (контроль), 2 – *S. cerevisiae* (с C₁₀H₈), 3 – *S. carlsbergensis* (контроль), 4 – *S. carlsbergensis* (с C₁₀H₈)

Количество живых клеток *S. carlsbergensis* и *S. cerevisiae* практически не изменяется после дальнейшего облучения до 800 Гр. Показано, что при дозе 400 Гр изменение доли мёртвых клеток уменьшается в 4–6% и при 800 Гр в 3–5% в присутствии нафталина по сравнению с контролем (рис. 4.2.3, кривая 4). Можно предположить, что продукт радиолиза – гидроксипроизводное нафталина – выступает в качестве защитного агента дрожжевых клеток от радиации.

Показано, что внесение нафталина в суспензию дрожжей *S. cerevisiae* усиливает негативное воздействие радиации. Это проявляется в более сильном снижении оптической плотности суспензии (рис. 4.2.2, кривая 2 ниже кривой 1), указывающем на большее уменьшение числа жизнеспособных/интактных клеток. В значительном повышении доли мертвых клеток при всех исследованных дозах радиации по сравнению с контролем (рис. 4.2.3, кривая 2 выше кривой 1). Можно предположить, что нафталин действует как радиосенсибилизатор для *S. cerevisiae*.

Внесение нафталина в суспензию дрожжей *S. carlsbergensis* напротив, ослабляет негативное воздействие радиации. Это проявляется: в менее выраженном снижении оптической плотности взвеси по сравнению с контролем (рис. 4.2.2, кривая 4 выше кривой 3), указывающем на лучшее сохранение жизнеспособных/интактных клеток, а также в существенно меньшей доле мертвых клеток при всех исследованных дозах радиации по сравнению с контролем (рис. 4.2.3, кривая 4 ниже кривой 3). Этот защитный эффект особенно выражен. Нафталин действует как радиопротектор для *S. carlsbergensis*.

Таким образом показано, что наличие нафталина в суспензии клеток не только сохраняет это различие, но и усиливает реакцию видов на радиацию, повышая чувствительность клеток *S. cerevisiae* и снижая чувствительность клеток *S. carlsbergensis*.

Результаты экспериментов по влиянию внесения 2,3-диаминонафталина на выживаемость дрожжей до и после облучения приведены в таблицах 4.2.5 – 4.2.12 и на рисунках 4.2.8 и 4.2.9.

Дрожжи вида *S. cerevisiae*:

Таблица 4.2.5 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2	2,3	2,1
$5 \cdot 10^{-4}$ М	1,93	1,95	2,0
Через 24 часа			
Контроль	2,25	2	1,9
$5 \cdot 10^{-4}$ М	2	2,1	2,3

Таблица 4.2.6 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	32 %	52 %	55 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	50 %	49 %	57 %
Через 24 часа			
Контроль	49 %	59 %	43 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	46 %	74 %	68 %

Дрожжи вида *S. carlsbergensis*:Таблица 4.2.7 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	3,65	3,6	3,45
$5 \cdot 10^{-4}$ М	3,5	3,2	3,4
Через 24 часа			
Контроль	3,4	3,55	3,45
$5 \cdot 10^{-4}$ М	3,4	2,9	3,4

Таблица 4.2.8 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	27 %	32 %	41 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	63 %	37 %	40 %
Через 24 часа			
Контроль	31 %	39 %	35 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	34 %	33 %	39 %

Исследование влияния 2,3-диаминонафталина на выживаемость дрожжей до и после облучения.

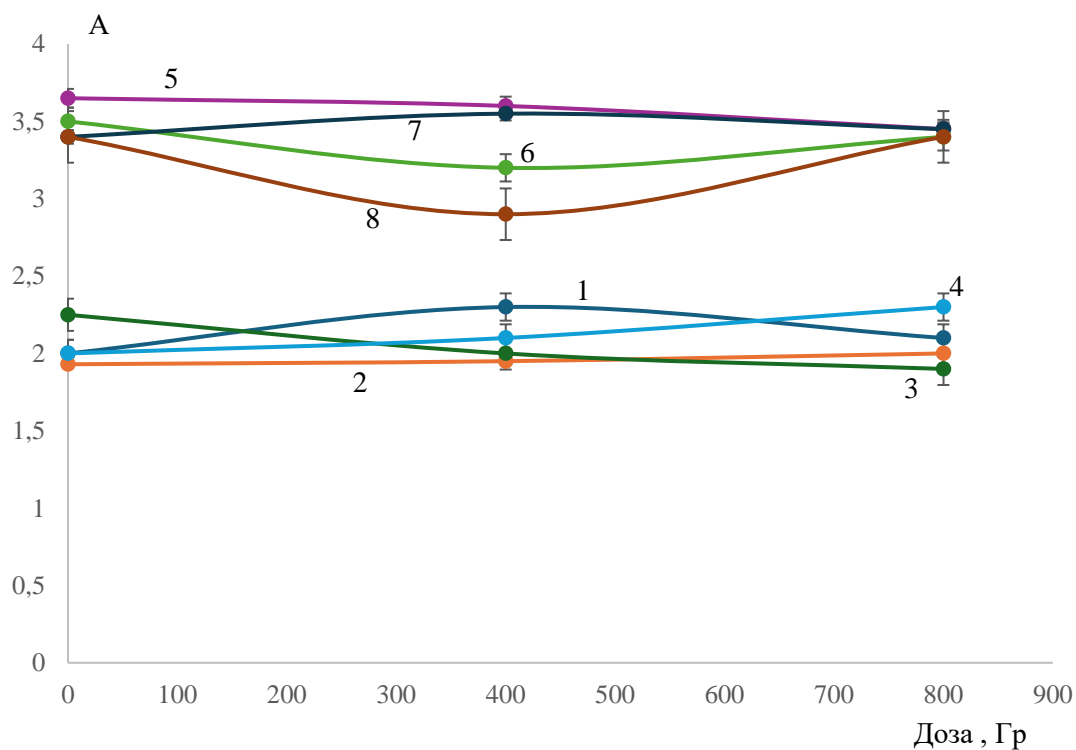


Рисунок 4.2.4 – Оптическая плотность суспензии дрожжей от дозы радиации в присутствии 2,3-диаминонафталина

1 – *S. cerevisiae* (контроль)

- 2 – *S. cerevisiae* (2,3-диаминонафталин)
- 3 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (контроль)
- 4 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (2,3-диаминонафталин)
- 5 – *S. carlsbergensis* (контроль)
- 6 – *S. carlsbergensis* (2,3-диаминонафталин)
- 7 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (контроль)
- 8 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (2,3-диаминонафталин)

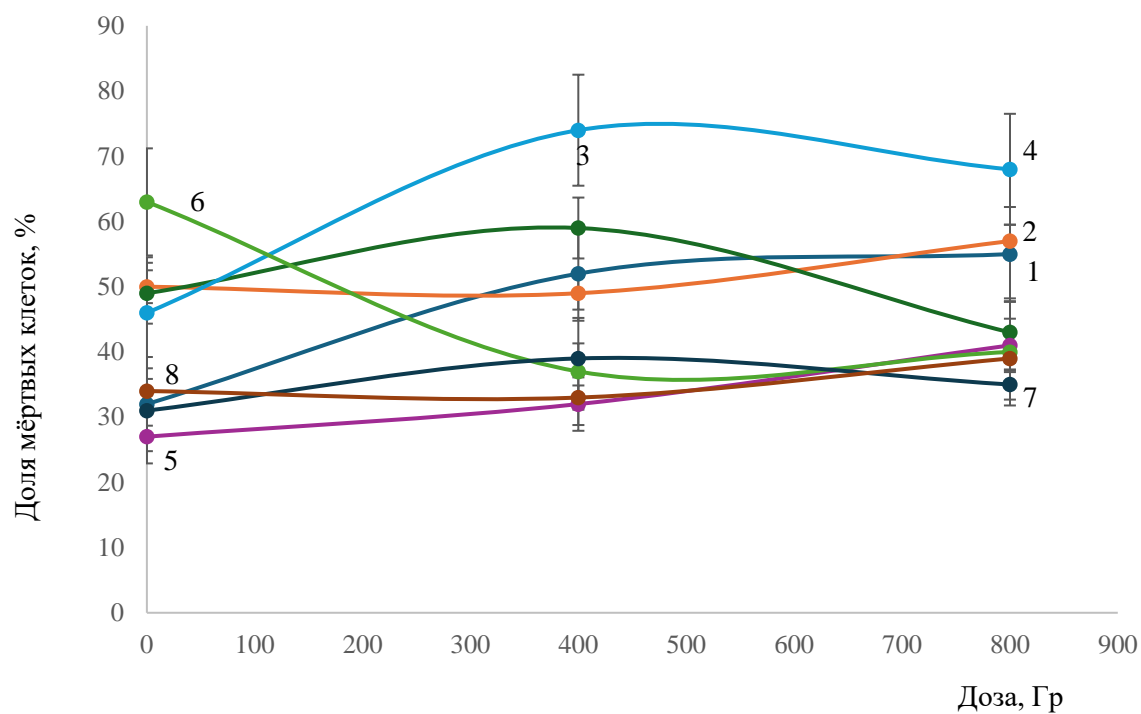


Рисунок 4.2.5 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей от дозы в присутствии 2,3-диаминонафталина

- 1 – *S. cerevisiae* (контроль)
- 2 – *S. cerevisiae* (2,3-диаминонафталин)
- 3 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (контроль)
- 4 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (2,3-диаминонафталин)
- 5 – *S. carlsbergensis* (контроль)

6 – *S. carlsbergensis* (2,3-диаминонафталин)

7 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (контроль)

8 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (2,3-диаминонафталин)

Из приведенных данных видно, что *S. carlsbergensis* более чувствителен к токсичности 2,3-диаминонафталина без облучения (63% vs 46% у *S. cerevisiae* через 3 часа) и лучше сохраняет оптическую плотность после облучения в контроле ($A = 3.45-3.55$).

Добавление 2,3-диаминонафталина к *S. cerevisiae* повышает радиопротекторные свойства, снижая гибель клеток после облучения (особенно при дозе 400 Гр), несмотря на умеренную исходную токсичность. Таким образом, высокая токсичность 2,3-диаминонафталина без облучения и неоднозначные эффекты при облучении указывают на видовую специфичность механизмов взаимодействия с радиацией. Для клеток *S. carlsbergensis* требуются более низкие концентрации вещества ($\leq 10^{-4}$ М) для минимизации токсичности и выявления потенциальной радиозащиты.

4.2.2 Влияние внесения нафталина и 2,3-диаминонафталина в присутствии АФК (H₂O₂) на выживаемость дрожжей до и после облучения

На данном этапе исследовали защитное действие фактора преадаптации дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* к окислительному стрессу в условиях освещения среды культивирования видимым светом. Окислительный стресс вызывался внесением в ферментационную среду [201, 202] сублетальных доз пероксида водорода. Параллельно апробировалось действие нафталина как возможного защитного агента, компенсирующего негативное воздействие стресса [203, 204]. Для адаптации к действию H₂O₂ культуры дрожжей выращивались на свету в стандартных условиях до окончания логарифмической или начала

стационарной фазы роста и после этого пересевались (пассировались) на новую среду. Инкубацию с нафталином проводили при внесении последнего в исходную питательную среду в концентрации 0,06 г/л.

Рис. 4.2.6 и рис. 4.2.7 иллюстрируют изменение конечной оптической плотности суспензии дрожжей, выращиваемых на свету на минеральной среде с добавкой нафталина, по мере пассирования клеток дрожжей к окислительному стрессу, индуцируемому внесением пероксида водорода.

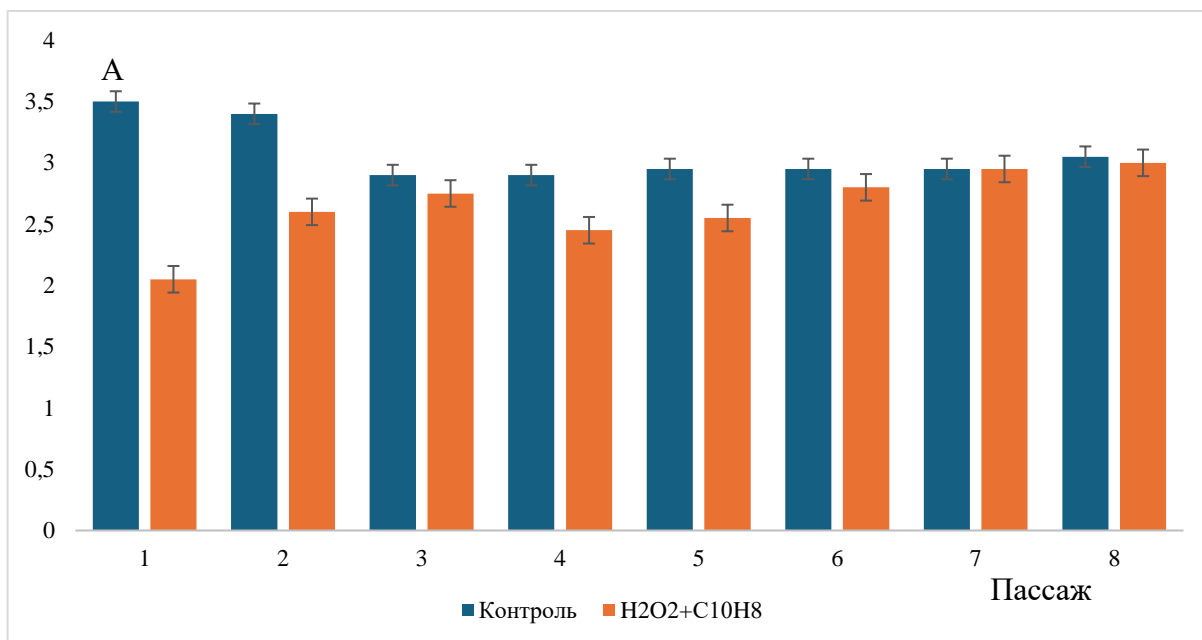


Рисунок 4.2.6– Изменения конечной оптической плотности суспензии дрожжей *S. cerevisiae*, шт. Т 985, пересеваемых в аэробных условиях на свету на среде с добавкой нафталина и внесением H₂O₂ по мере увеличения количества пассажей.

1 – контроль; 2 – с внесением H₂O₂ + C₁₀H₈

Видно, что при культивировании [205] на свету конечная оптическая плотность суспензии клеток обоих видов дрожжей, подвергаемых окислительному стрессу, в первые три пассажа ниже, чем в контроле (без стресса), но приближается к уровню контроля после 4 пассажа. Это свидетельствует об адаптации клеток к

окислительному воздействию уже через несколько поколений. В то же время в темноте такой адаптации не происходило (данные не приведены).

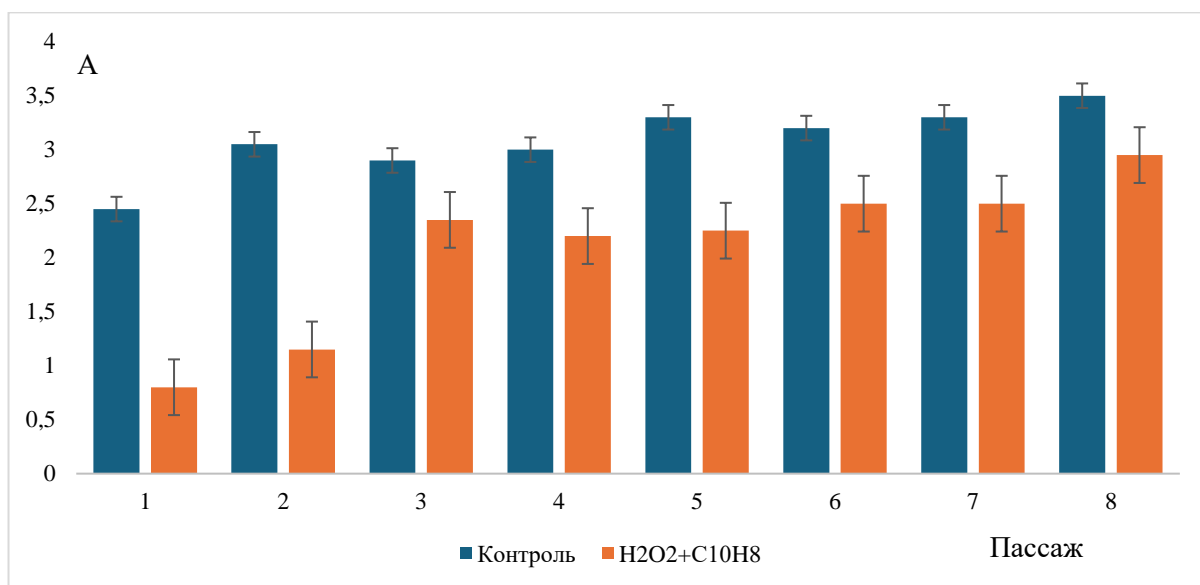


Рисунок 4.2.7 – Изменения конечной оптической плотности суспензии дрожжей *S. carlsbergensis*, пересеваемых в аэробных условиях на свету на среде с добавкой нафталина и внесением H₂O₂ по мере увеличения количества пассажей.

1 – контроль; 2 – с внесением H₂O₂ + C₁₀H₈

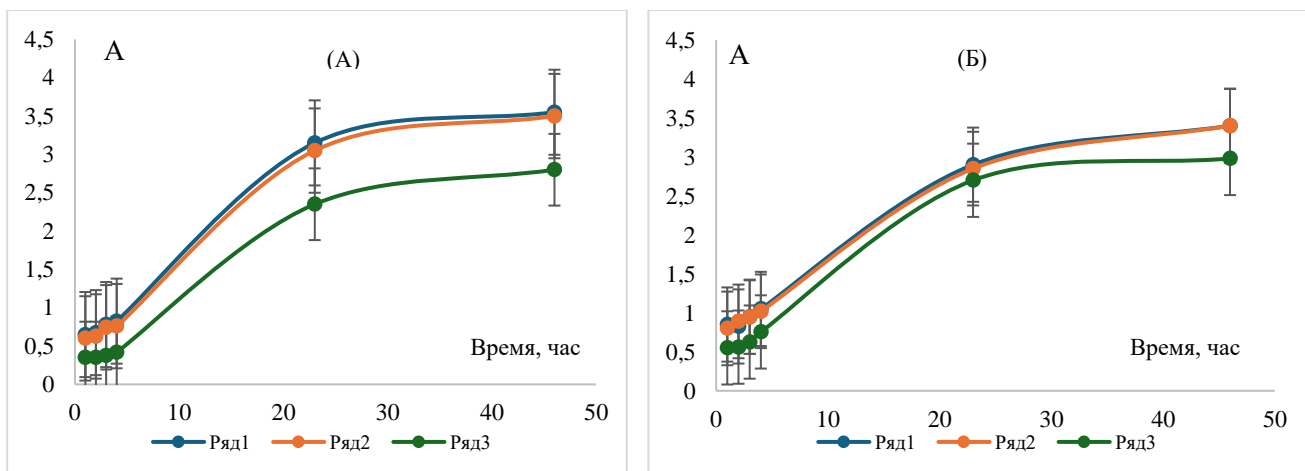


Рисунок 4.2.8– Динамика роста дрожжей *S. cerevisiae* (а) и *S. carlsbergensis* (б) : 1 – контроль, 2 – H₂O₂ + C₁₀H₈, 3 – H₂O₂

На рис. 4.2.8 представлена кривая роста дрожжей *S. cerevisiae* первого пассажа (без адаптации к окислительному стрессу) при добавлении в ферментационную среду пероксида водорода и нафталина. Видно, что внесение нафталина снижает негативное воздействие пероксида водорода на клетки дрожжей, при этом позитивный эффект более выражен для дрожжей *S. cerevisiae*, по сравнению с дрожжами *S. carlsbergensis*.

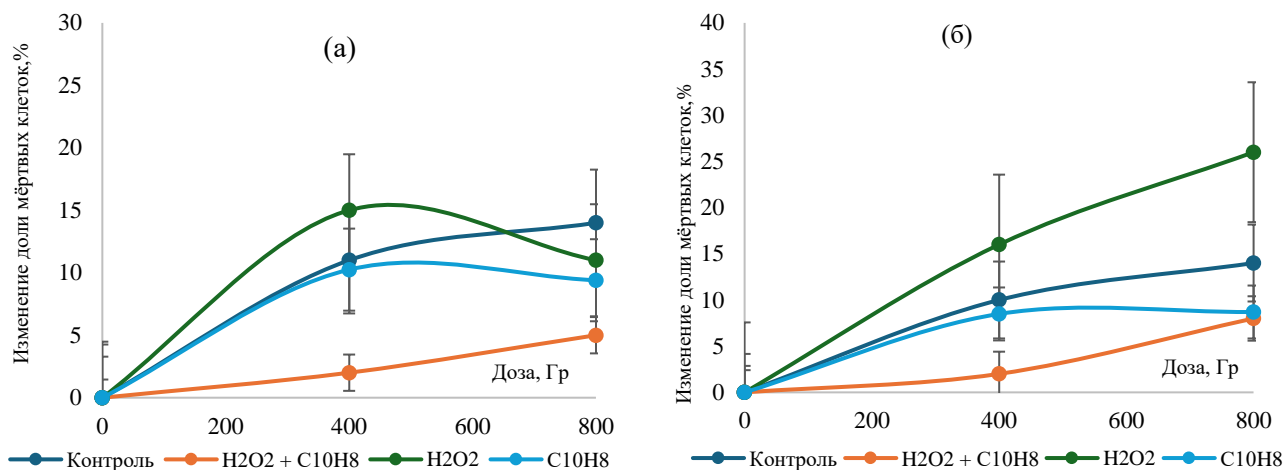


Рисунок 4.2.9 – дрожжей *S. cerevisiae* (а) и *S. carlsbergensis* (б)

в зависимости от поглощенной дозы облучения для следующих систем:

1 – контроль, 2 – H₂O₂ + C₁₀H₈, 3 – H₂O₂, 4 – C₁₀H₈

На рис. 4.2.9 показано изменение доли мёртвых клеток дрожжей, неадаптированных к пероксиду водорода, в зависимости от дозы рентгеновского облучения. При дозе облучения от 0 до 400 Гр доли мертвых клеток в обоих штаммах близки, во всех вариантах воздействия, однако при более высоких дозах клетки *S. carlsbergensis* более чувствительны к облучению по сравнению с клетками *S. cerevisiae*. Внесение пероксида водорода приводит к резкому снижению устойчивости дрожжей к стрессу и отмиранию клеток в пост-радиационный период. С другой стороны, внесение нафталина на фоне внесения пероксида водорода в пост-радиационный период резко снижает долю мертвых клеток, т. е.

устойчивость дрожжей к ионизирующему и окислительному воздействию заметно повышается. Таким образом, внесение нафталина в питательную среду способствует развитию резистентности дрожжей к окислительному действию пероксида водорода и ионизирующего рентгеновского излучения [206, 207].

Результаты экспериментов по влиянию **2,3-диаминонафталина и АФК (H₂O₂) на выживаемость дрожжей до и после облучения** приведены в таблицах 4.2.9 – 4.2.12 и на рисунках 4.2.10 и 4.2.11.

Дрожжи вида *S. cerevisiae*:

Таблица 4.2.9 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2	2,3	2,1
5·10 ⁻⁴ М	1,7	1,6	1,8
Через 24 часа			
Контроль	2,25	2	1,9
5·10 ⁻⁴ М	1,85	1,45	1,55

Таблица 4.2.10 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	32 %	52 %	55 %
5·10 ⁻⁴ М	46 %	43 %	50 %
Через 24 часа			
Контроль	49 %	59 %	43 %
5·10 ⁻⁴ М	46 %	39 %	44 %

*Дрожжи вида S. carlsbergensis:*Таблица 4.2.11 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	3,65	3,6	3,45
$5 \cdot 10^{-4}$ М	0,67	0,7	0,75
Через 24 часа			
Контроль	3,4	3,55	3,45
$5 \cdot 10^{-4}$ М	0,7	1,4	0,54

Таблица 4.2.12 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	27 %	32 %	41 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	99 %	99 %	99 %
Через 24 часа			
Контроль	31 %	39 %	35 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	99 %	98 %	95 %

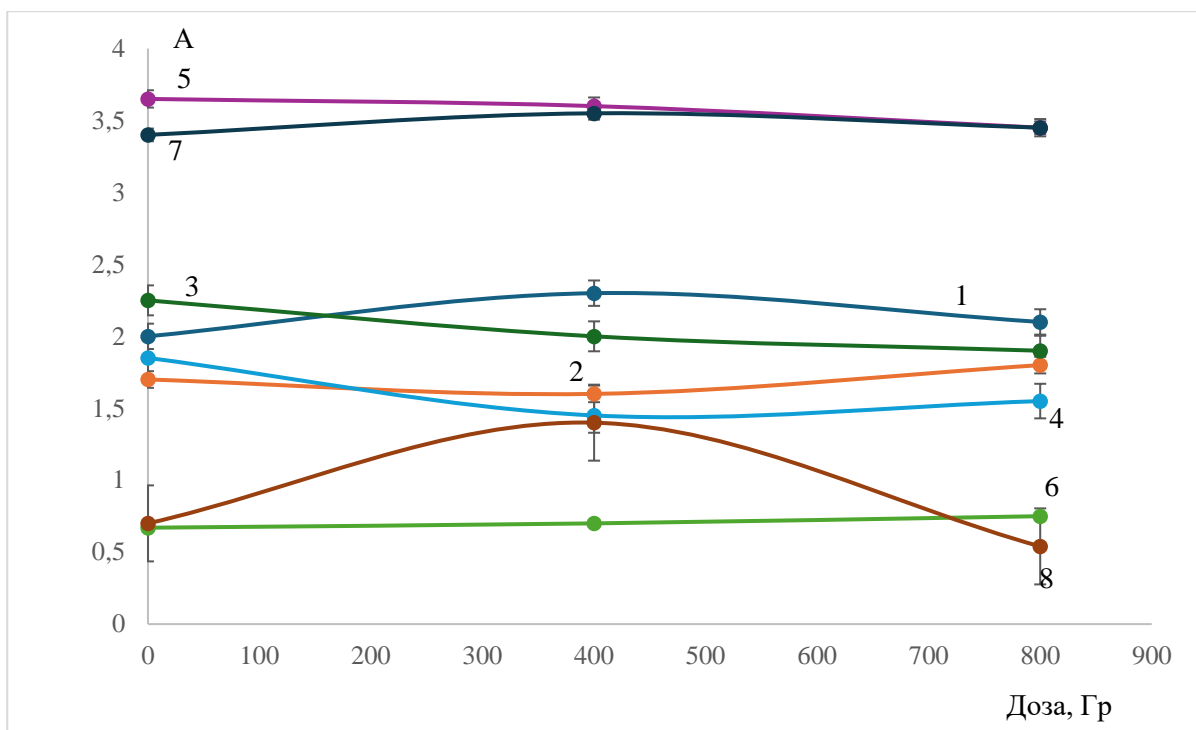


Рисунок 4.2.10 – Оптическая плотность суспензии дрожжей от дозы облучения в присутствии 2,3-диаминонафталина и H_2O_2 :

- 1 – *S. cerevisiae* (контроль)
- 2 – *S. cerevisiae* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)
- 3 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (контроль)
- 4 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)
- 5 – *S. carlsbergensis* (контроль)
- 6 – *S. carlsbergensis* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)
- 7 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (контроль)
- 8 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)

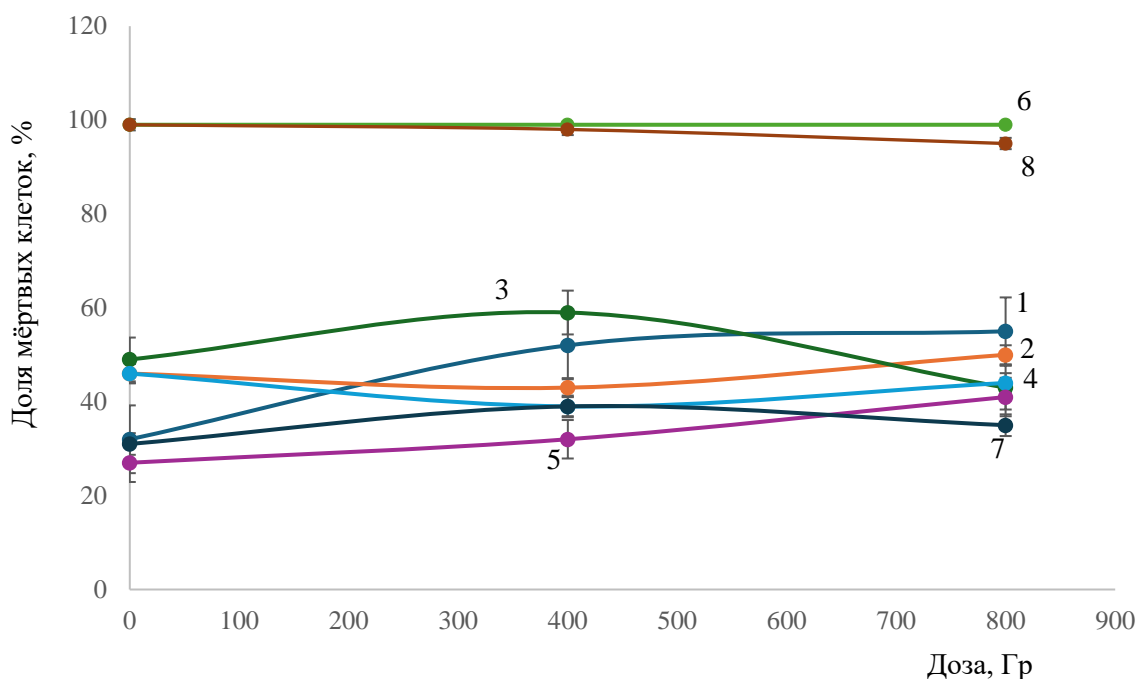


Рисунок 4.2.11 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей в присутствии 2,3-диаминонафталина и H_2O_2 :

- 1 – *S. cerevisiae* (контроль)
- 2 – *S. cerevisiae* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)
- 3 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (контроль)
- 4 – постэффект дрожжей *S. cerevisiae* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)
- 5 – *S. carlsbergensis* (контроль)
- 6 – *S. carlsbergensis* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)
- 7 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (контроль)
- 8 – постэффект дрожжей *S. carlsbergensis* (смесь 2,3-диаминонафталина и H_2O_2)

Известно, что на клеточном уровне и в субклеточных структурах воздействие ионизирующего излучения вызывает различные реакции: от временной задержки деления клеток до их гибели. В клетках функционирует сложный комплекс ферментных систем, поддерживающих структурную целостность генома. К одной из них относят разнообразные ферменты репарации ДНК, распознающие дефекты

ее структуры, «ремонтирующие» ее при лучевых повреждениях путем специфического устранения различных повреждений и восстановления структуры и функции ДНК, а вместе с тем и нормального клеточного деления. Известно [209], что на клеточном уровне воздействие ионизирующего излучения обусловлено взаимодействием свободных радикалов с молекулами белков, нуклеиновых кислот и липидов, когда вследствие всех этих процессов образуются органические пероксиды и быстропроходящие реакции окисления. В результате пероксидного окисления в клетке накапливается множество измененных молекул, в результате чего начальный радиационный эффект многократно усиливается. Влияние 2,3-диаминнафталина на дрожжи не является широкодоступной. Однако, в целом, химические вещества могут оказывать различное воздействие на дрожжевые клетки, в зависимости от их природы и концентрации. Данные, представленные в настоящей работе, показывают, что на фоне комбинированного воздействия физических антиоксидантных факторов, таких как видимый свет, и соединений химической природы, в частности, нафталина, повреждающее действие ионизирующего излучения на клеточные структуры и летальное воздействие на живые клетки микроорганизмов существенно нивелируется.

4.2.3 Исследование влияния антиоксидантных свойств экстрактов донника, багульника и лабазника на клетки дрожжей

Результаты спектрофотометрических исследований радиационно-химических превращений водных экстрактов лабазника представлены на рисунке 4.2.12. Показано изменение оптической плотности облученных образцов в отсутствие кислорода от дозы в диапазоне от 0,2 до 18,3 кГр. Удаление кислорода путем насыщения раствора инертным газообразным гелием позволяет моделировать окислительные процессы в условиях гипоксии в биологических

системах. На вставке (рис. 4.2.12) показан характер этих изменений интенсивности полос поглощения при $\lambda_1 \sim 270$ нм и $\lambda_2 \sim 350$ нм в зависимости от дозы облучения образцов в аэрированных и деаэрированных условиях.

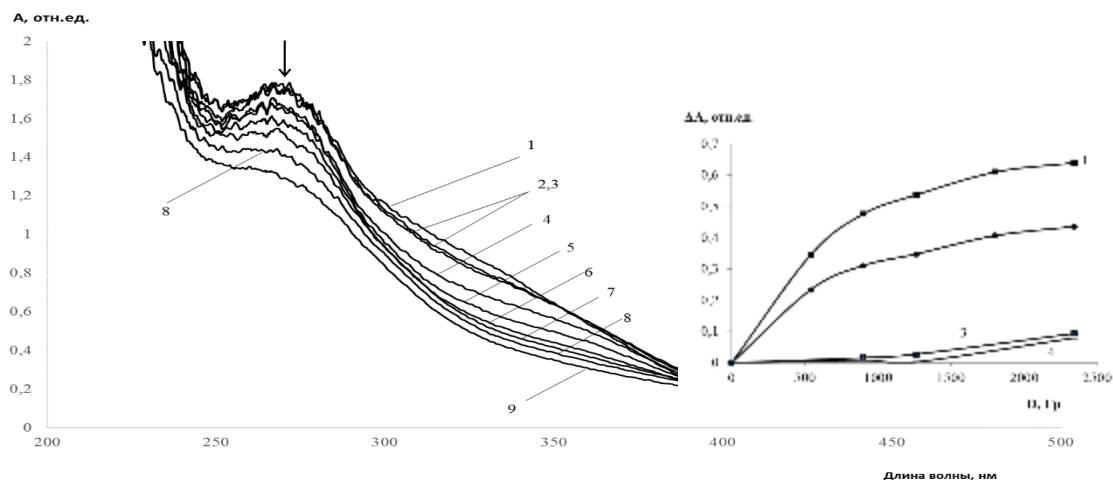


Рисунок 4.2.12 – Изменение спектров оптического поглощения аэрированного водного экстракта лабазника в соотношении 1:50 в зависимости от дозы (кГр): 1 – 0, 2 – 0.9, 3 – 1.3, 4 – 2.3, 5 – 4.5, 6 – 7.2, 7 – 10.8, 8 – 14.4, 9 – 18.3. На вставке показаны зависимости изменения OD водных экстрактов (L.) A от дозы в условиях деаэрации при $\lambda = 270$ нм (кривая 1) и $\lambda = 350$ нм (кривая 2) и в аэрированных условиях при $\lambda = 270$ нм (кривая 3) и $\lambda = 350$ нм (кривая 4). Длина оптического пути кюветы составляет 1 см

Видно, что система с экстрактом лабазника в присутствии кислорода воздуха достаточно стабильна при облучении до $\sim 0,9$ кГр. Важно обратить внимание на тот факт, что при одной и той же дозе облучения наклон кривых зависимости $OD = f$ (доза) для образцов деаэрированного экстракта изменяется, вероятно, из-за вклада продукта радиолиза воды и кислорода. При сравнении зависимости OD было установлено, что после воздействия ~ 2 кГр в деаэрированных условиях значения OD в 10 раз меньше, чем в аэрированных растворах.

Следовательно, именно с увеличением расхода активных компонентов экстрактов лабазника на взаимодействие с реакционными центрами связана с их

высокой антирадикальной активностью в отношении короткоживущих частиц водного радиолиза.

Поэтому нами были проведены эксперименты по оценке антирадикальной активности растительных экстрактов по измерению оптической плотности суспензий дрожжей и доли мертвых клеток до и после облучения.

Результаты экспериментов по накоплению биомассы дрожжей в разных пассажах культивирования приведены в таблицах 4.2.13 – 4.2.18.

Таблица 4.2.13 – Биомасса (г/л) дрожжей *S. cerevisiae* и внесения экстракта лабазника

Пассаж	Контроль <i>S. cerevisiae</i>	Экстракт лабазника
1	4,2	4,4
2	4,1	4,2
3	3,5	3,7
4	3,5	3,8
5	3,5	4,2
6	3,5	4,0
7	3,5	4,0

Таблица 4.2.14 – Биомасса(г/л) дрожжей *S. carlsbergensis* и внесения экстракта лабазника

Пассаж	Контроль <i>S. carlsbergensis</i>	Экстракт лабазника
1	3,3	4,3
2	3,7	3,9
3	3,5	3,5
4	3,6	3,9
5	4,0	4,1
6	3,8	4,2
7	4,0	4,1

Таблица 4.2.15 – Биомасса(г/л) дрожжей *S. cerevisiae* и внесения экстракта багульника

Пассаж	Контроль <i>S. cerevisiae</i>	Экстракт багульника
1	3,7	3,7
2	3,7	3,7
3	3,4	4,0
4	3,4	3,4
5	3,8	4,6
6	4,0	3,6
7	4,0	3,7

Таблица 4.2.16 – Биомасса(г/л) дрожжей *S. cerevisiae* и внесения экстракта донника

Пассаж	Контроль <i>S. cerevisiae</i>	Экстракт донника
1	3,7	3,8
2	3,7	3,7
3	3,4	3,5
4	3,4	3,8
5	3,8	4,0
6	4,0	4,0
7	4,0	4,0

Таблица 4.2.17 – Биомасса(г/л) дрожжей *S. carlsbergensis* и внесения экстракта багульника

Пассаж	Контроль <i>S. carlsbergensis</i>	Экстракт багульника
1	4,2	4,0
2	3,7	3,8
3	3,7	4,0
4	3,8	3,7
5	4,1	4,2
6	4,3	4,2
7	3,8	3,9

Таблица 4.2.18 – Биомасса(г/л) дрожжей *S. carlsbergensis* и внесения экстракта донника

Пассаж	Контроль <i>S. carlsbergensis</i>	Экстракт донника
1	4,2	4,0
2	3,7	4,0
3	3,7	4,1
4	3,8	4,1
5	4,1	4,7
6	4,3	4,3
7	3,8	4,2

В состав экстрактов лекарственных растений входит ряд полифенольных веществ, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, микроэлементов и других, обладающих антиоксидантным и радиозащитным действием [7]. На рисунках 4.2.13 и 4.2.14 показаны изменения конечного уровня накопления биомассы *S. carlsbergensis* и *S. cerevisiae* в аэробных условиях по мере увеличения числа

пассажей при введении водного экстракта лабазника, донника лекарственного и багульника болотного [208, 213].

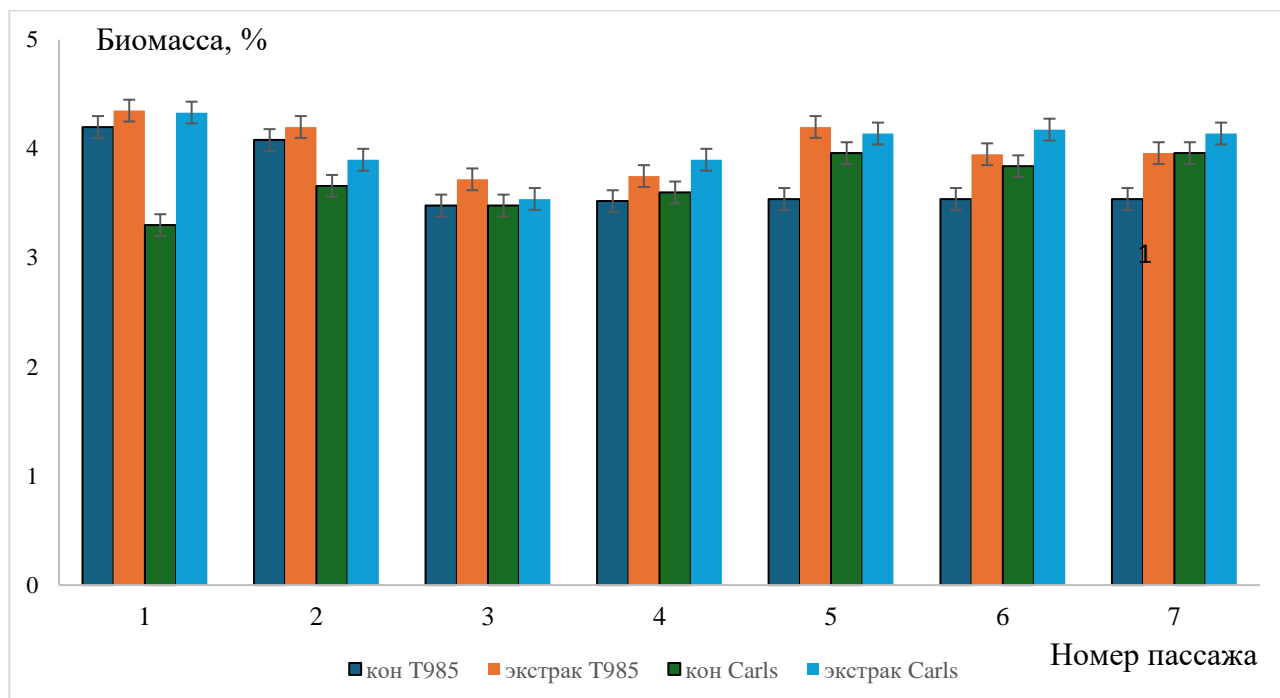


Рисунок 4.2.13 – Изменение конечного уровня накопления биомассы *S. carlsbergensis* и *S. cerevisiae* в аэробных условиях по мере увеличения числа пассажей при введении водного экстракта лабазника: 1 – контроль *S. cerevisiae*, 2– контроль *S. carlsbergensis*, 3 – введение экстракта лабазника и *S. cerevisiae*, 4 – введение из экстракта лабазника *S. carlsbergensis*

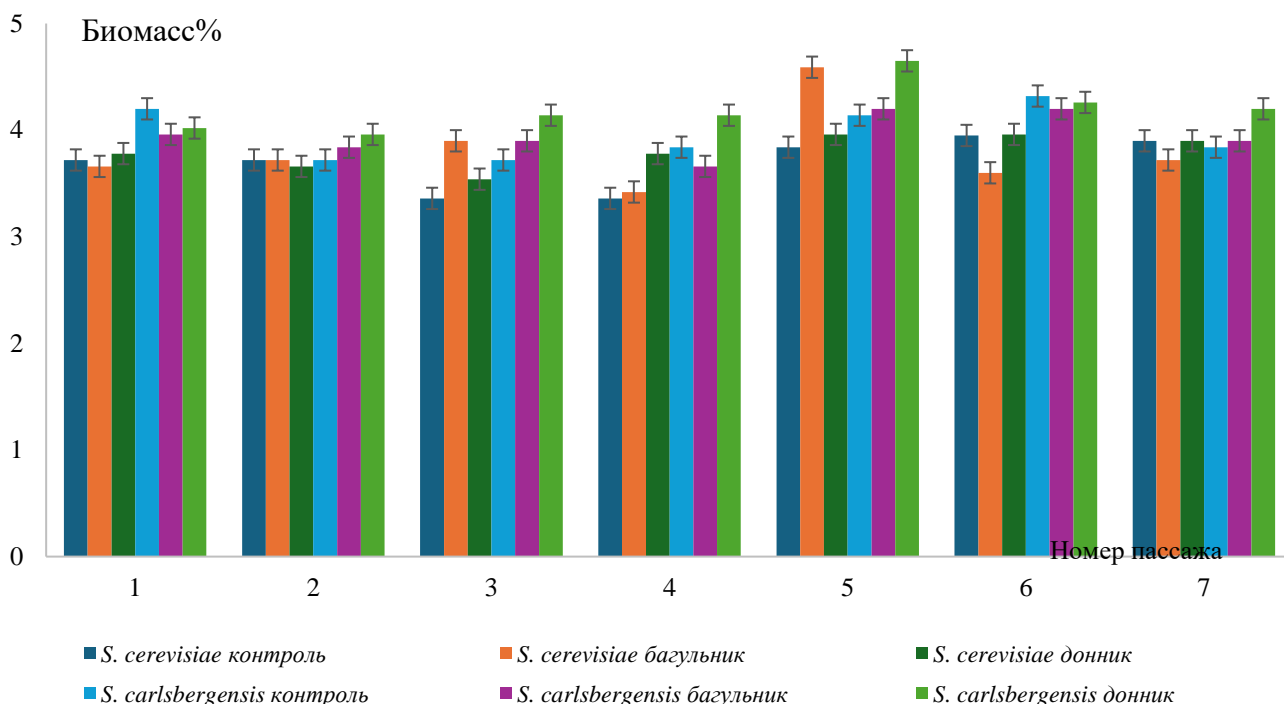


Рисунок 4.2.14 – Изменение конечного уровня накопления биомассы *S. carlsbergensis* и *S. cerevisiae* в аэробных условиях при увеличении числа пассажей при введении водного экстракта донника лекарственного и багульника болотного

Таблица 4.2.19 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при введении водного экстракта лабазника

Доза, Гр	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % <i>S. cerevisiae</i>	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % при внесении экстракта лабазника
0	11	6
400	22	10
800	25	14

Таблица 4.2.20 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* при введении водного экстракта лабазника

Доза, Гр	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % <i>S. carlsbergensis</i>	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % при внесении экстракта лабазника
0	10	8
400	20	12
800	24	18

Таблица – 4.2.21 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при введении водного экстракта багульника

Доза, Гр	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % <i>S. cerevisiae</i>	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % при внесении экстракта багульника
0	11	9
400	48	43
800	52	40

Таблица 4.2.22 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* при введении водного экстракта багульника

Доза, Гр	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % <i>S. carlsbergensis</i>	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % при внесении экстракта багульника
0	10	9
400	50	43
800	55	40

Таблица 4.2.23 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при введении водного экстракта донника

Доза, Гр	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % <i>S. cerevisiae</i>	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % при внесении экстракта донника
0	11	9
400	48	26
800	52	30

Таблица 4.2.24 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* при введении водного экстракта донника

Доза, Гр	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % <i>S. carlsbergensis</i>	Доля мёртвых клеток через 3 часа, % при внесении экстракта донника
0	10	7,5
400	50	30
800	55	32

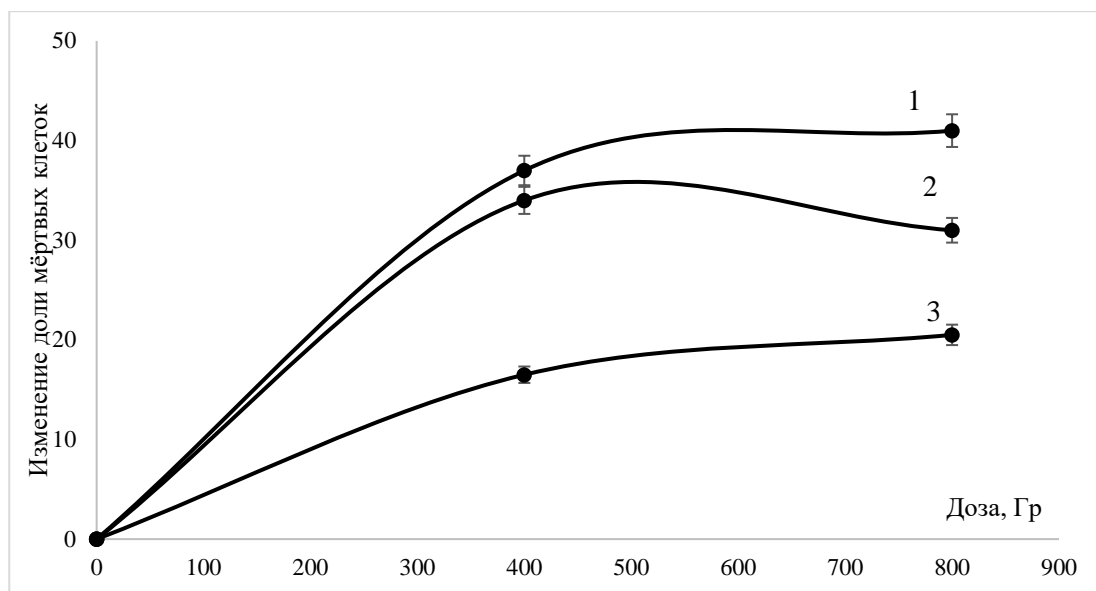


Рисунок 4.2.15 – Изменение доли мёртвых клеток *S. cerevisiae* в зависимости от дозы облучения при последующем содержании дрожжевой суспензии: 1 – контроль, 2 – введение водного экстракта багульника, 3 – введение водного экстракта донника

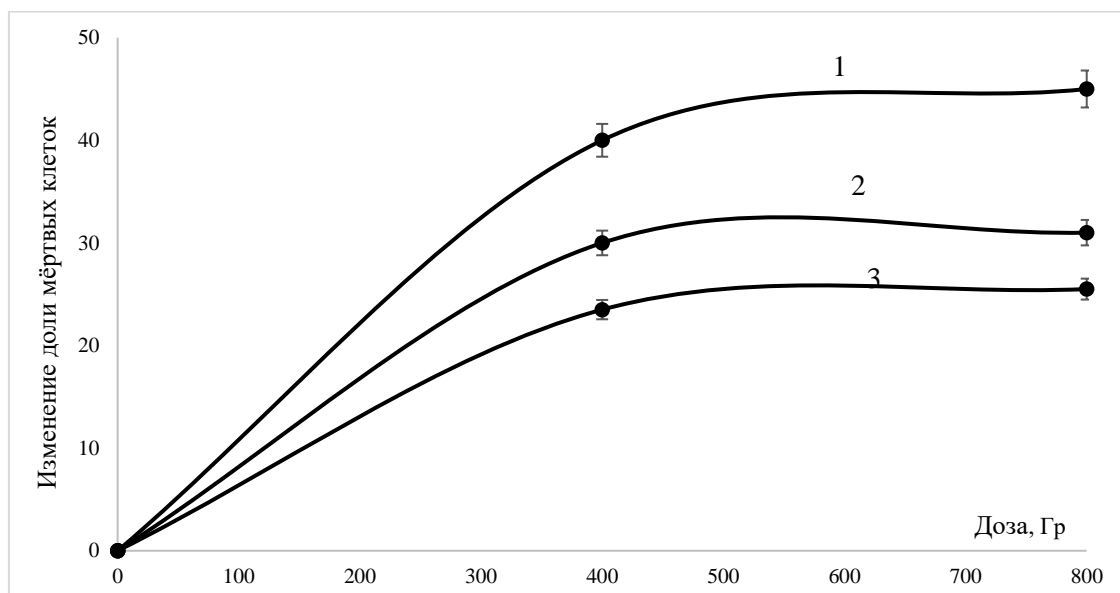


Рисунок 4.2.16 – Изменение доли мёртвых клеток *S. carlsbergensis* в зависимости от дозы облучения при последующем содержании дрожжевой суспензии: 1 – контроль, 2 – введение водного экстракта багульника, 3 – введение водного экстракта донника

На рисунке 4.2.14 показано, что биомасса дрожжей *S. cerevisiae* с багульника выше, чем у дрожжей с присутствием донника. И биомасса дрожжей *S. carlsbergensis* с присутствием донника выше, чем у дрожжей с присутствием багульника. На рисунках 4.2.15 и 4.2.16 показано, что после рентгеновского облучения мы сравниваем контроль без добавления растительных экстрактов с присутствием багульника болотного и донника. Можно видеть, что при дозе 400 Гр изменение доли мертвых дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в присутствии багульника достигает 34%, а при дозе 800 Гр – 31% по сравнению с контролем. И *S. carlsbergensis* в дозе 400 Гр – 30% и в дозе 800 Гр – 31% при сравнении с контролем. И даже изменение доли погибших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* при наличии донника в дозе 400 Гр составляет 16%, при дозе 800 Гр – 20% при сравнении с контролем. *S. carlsbergensis* при наличии донника в дозе 400 Гр – 20% при сравнении с контролем. 23% и при дозе 800 Гр – 25% при сравнении с контролем.

4.3. Влияние рутина и ионола на выживаемость дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

В ходе исследований были обнаружены и доказаны антиоксидантные свойства различных биологически активных веществ, некоторыми из которых являются биофлавоноиды: рутин, ионол, катехины, кверцетин и другие [210]. Рутин обладает укрепляющим стенки капилляров действием (повышение резистентности), снижает проницаемость стенок капилляров. Существенная роль в механизме действия принадлежит антиоксидантным свойствам, в частности способности тормозить свободнорадикальные процессы пероксидного окисления липидов, что способствует снижению риска развития сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, радиопротекторным свойствам. Рутин, также называемый рутозидом, кверцетин-3-О-рутинозидом и софорином, представляет собой гликозид, объединяющий флавонол кверцетин и дисахарид рутинозу (α -

Грамнопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозу). Это флавоноид, содержащийся в широком разнообразии растений, включая цитрусовые. Анализ литературных данных показывает, что основная функция фенольных соединений заключается в защите клеток от негативного влияния факторов среды. Антирадикальная активность фенольных соединений, их способность тормозить свободнорадикальные реакции играет важную роль в антимуtagenном эффекте, уменьшая опасность образования наследственных нарушений [213].

Реакционную способность фенолов связывают со свободными радикалами, обладающими химической активностью и способностью вступать в быстрые цепные свободнорадикальные реакции. Контролировать эти реакции можно с помощью веществ полифенольной природы (например, кумарины, флавоноиды и др) [214]. Известно, что флавоноиды проявляют антиоксидантную активность и способны захватывать свободные радикалы или превращать их в неактивные. В данной работе рассматриваются влияние рутина на радиационную устойчивость дрожжевых клеток *S. cerevisiae*.

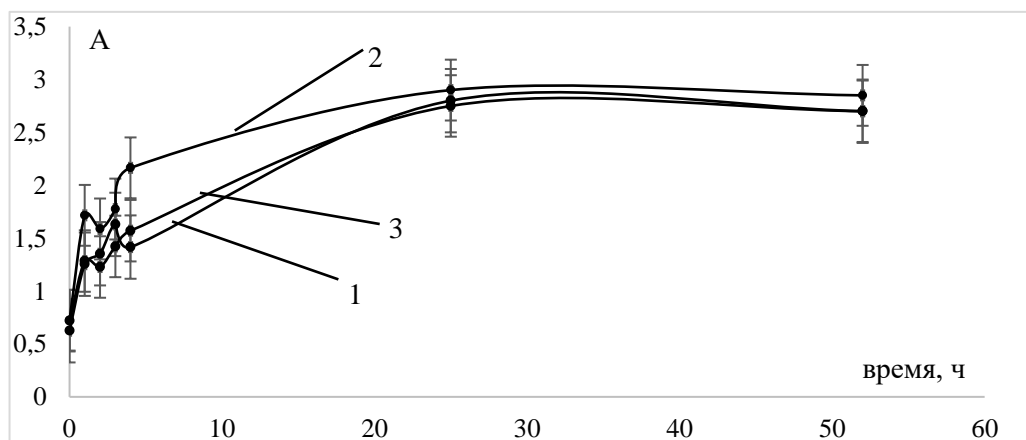


Рисунок 4.3.1 – Динамика роста дрожжей *S. cerevisiae* от времени культивирования; 1– контроль, 2– в внесение рутина ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), 3– в внесение рутина ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

Оценка динамики роста дрожжей *S. cerevisiae* от времени культивирования в внесение рутина ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) представлена на рис.4.3.1. Рост оптической плотности в случае контроля при освещении видимым светом, рост дрожжей увеличивается. А после введения рутина показано более увеличение роста дрожжей клеток. В результате воздействия рутина при различных концентрациях включает выращивание культуры дрожжей в стандартных условиях до конца логарифмической или начала стационарной фазы роста, инкубацию с антиоксидативным агентом. Средство представлено антиоксидантом – рутином в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Время инкубации с антиоксидативным средством составляет 24–52 часов. Полученные данные указывают на значительную вариабельность процесса Рутин в дрожжевых клетках *S. cerevisiae*. Фактор времени внес значительный вклад в повышение эффективности Рутин. Наблюдается четкая положительная зависимость роста эффективности добавления Рутин с разными концентрациями от продолжительности ведения процесса. До 24 часа все линии динамики роста дрожжей *S. cerevisiae* с рутином очевидно увеличивается по отношению контроля.

4.3.1 Влияние рутина с концентрацией (10^{-4} моль/л) и (10^{-5} моль/л) в 40% растворе этанола на выживаемость дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

Экспериментальные данные по оценке выживаемости дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* до и после облучения при добавлении спиртовых растворов рутина приведены в таблицах (4.3.1 – 4.3.18), (4.3.25 – 4.3.28) и рисунках 4.3.19 – 4.3.22.

Таблица. 4.3.1– Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* спустя 3 и 24 часа после облучения

Доза, Гр	<i>S. cerevisiae</i> (3 ч)	<i>S. cerevisiae</i> (24 ч)
0	22%	30%
200	25%	38%
400	29%	37%
800	40%	38%
1200	40%	42%
2000	46%	48%
4000	46%	50%
6000	45%	49%

Таблица 4.3.2 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при добавлении рутина спустя 3 и 24 часа после облучения

Доза, Гр	<i>S. cerevisiae</i> +Rut 0,1mM (3 ч)	<i>S. cerevisiae</i> +Rut 0,1mM (24 ч)
0	18%	17%
200	27%	22%
400	28%	23%
800	31%	32%
1200	37%	36%
2000	41%	44%
4000	39%	40%
6000	46%	48%

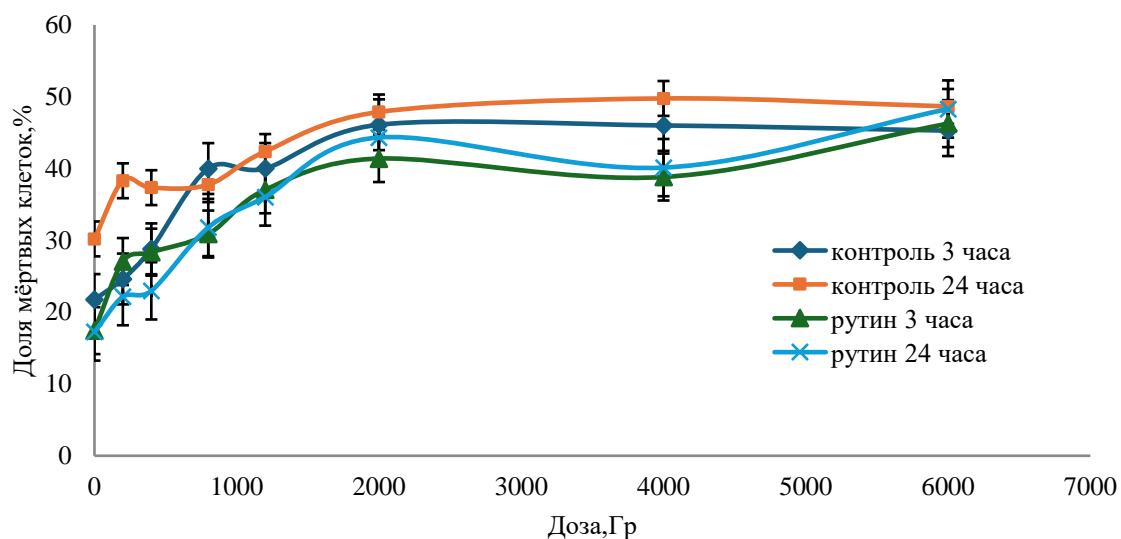


Рисунок 4.3.2 – Зависимость доли мёртвых клеток от полученной дозы
(концентрация рутина 0,5mM)

Таблица. 4.3.3 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* спустя 3 и 24 часа после облучения. (концентрация рутина 0,5mM)

Доза, Гр	<i>S. cerevisiae</i> (3 ч)	<i>S. cerevisiae</i> (24 ч)
0	11%	11%
200	25%	28%
400	26%	27%
800	27%	26%
1200	29%	29%
2000	29%	31%
4000	36%	38%
6000	39%	42%

Таблица 4.3.4 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при добавлении рутина 0,05mM спустя 3 и 24 часа после облучения (использовался рутин в 40% растворе этанола)

Доза, Гр	<i>S. cerevisiae</i> +Rut 0,05mM (3 ч)	<i>S. cerevisiae</i> +Rut 0,05mM (24 ч)
0	14%	20%
200	18%	22%
400	22%	19%
800	21%	20%
1200	24%	23%
2000	23%	20%
4000	30%	25%
6000	34%	26%

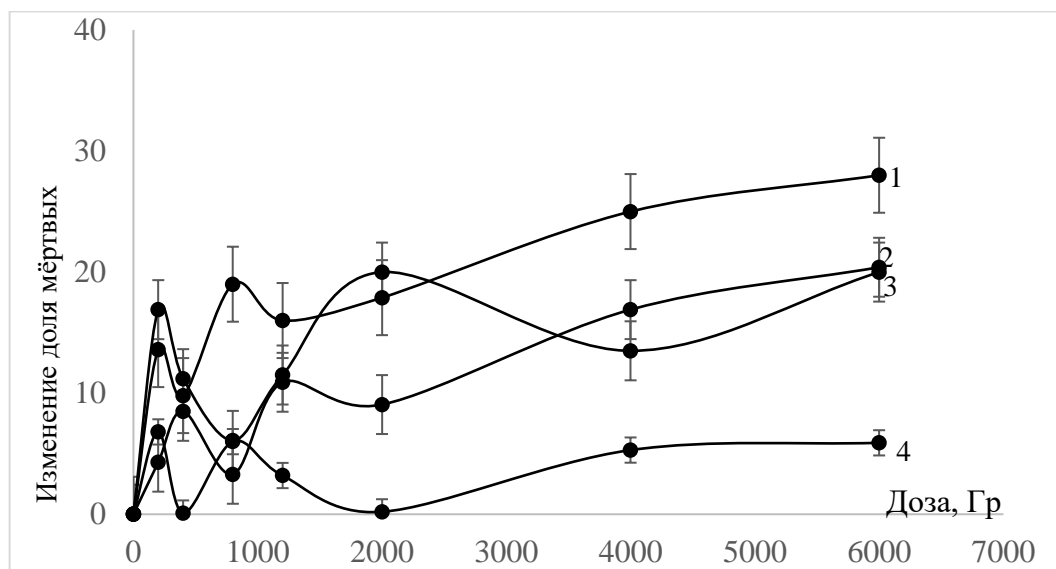


Рисунок 4.3.3 – Изменение доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы; 1– контроль (3 часа после облучения), 2– контроль (пост-эффект 24 часа), 3– внесение рутина (3 часа после облучения), 4– (пост-эффект 24 часа) (концентрация рутина 0,5mM)

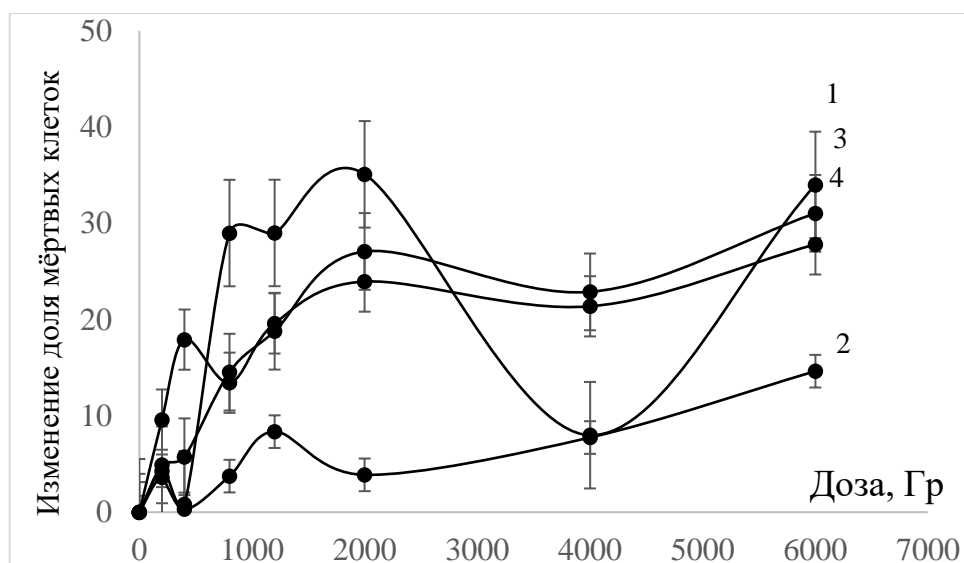


Рисунок 4.3.4 – Изменение доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы; 1– контроль (3 часа после облучения), 2– контроль (пост-эффект 24 часа), 3– внесение рутина (3 часа после облучения), 4– (пост-эффект 24 часа) (концентрация рутина 0,05mM)

На рис.4.3.3 и 4.3.4 показано изменение доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при внесении рутина с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л после 3 и 24 часа рентгеновского облучения. Влияние рутина на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* может зависеть от концентрации. Изменение доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* с рутином ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) уменьшается до 20% по сравнению контролем при пост-эффекте 24 часа после облучения, при пост-эффекте 3 часа после облучения до – 15%. При концентрации рутина $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л изменение доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* с рутином ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) после 3 часа и 24 часа облучения практически не изменяется, кроме контрольного образца. Таким образом показано, что более высокие концентрации антиоксидантов, таких как рутин с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, могут оказывать более сильное защитное действие против оксидативного стресса и повреждения ДНК, вызванных облучением или другими стрессовыми факторами. В исследованиях было показано, что рутин способен уменьшать оксидативный стресс

и повреждение ДНК, вызванные облучением. Это может быть связано с его способностью нейтрализовать свободные радикалы и восстанавливать повреждённые молекулы.

Пассаж 1:

Таблица 4.3.5 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2,8	2,55	2,5
1 мМ рутин (40% Et)	2,6	2,65	2,5
0,1 мМ рутин (40% Et)	2,45	2,35	2,5
Через 24 часа			
Контроль	2,7	2,85	2,7
1 мМ рутин (40% Et)	2,75	2,75	2,7
0,1 мМ рутин (40% Et)	2,65	2,5	2,6

Таблица 4.3.6 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	42%	55%	54%
10^{-4} моль/л	36%	41%	36%
10^{-5} моль/л	28%	33%	36%
Через 24 часа			
Контроль	39%	42%	60%
10^{-4} моль/л	45%	40%	27%
10^{-5} моль/л	34%	36%	32%

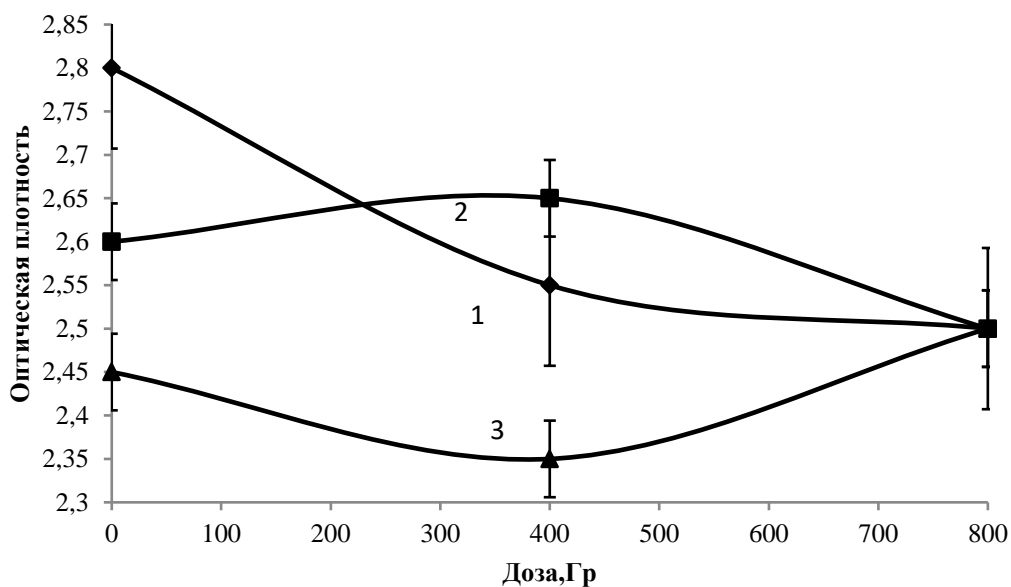


Рисунок 4.3.5 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей *S. cerevisiae* от полученной дозы через 3 часа после облучения. 1– контроль, 2– $5 \cdot 10^{-4}$, 3– $5 \cdot 10^{-5}$

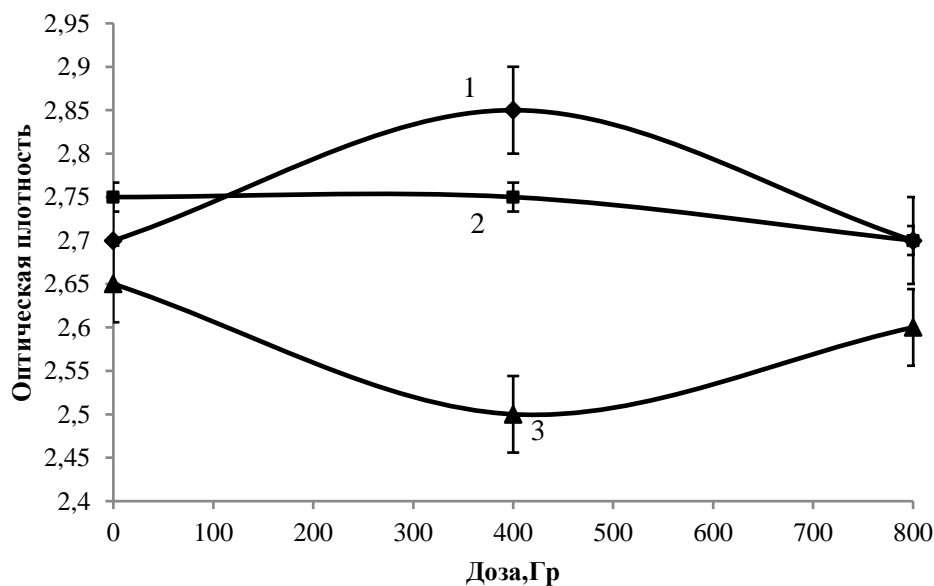


Рисунок 4.3.6– Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей *S. cerevisiae* от полученной дозы через 24 часа после облучения. 1- контроль, 2– $5 \cdot 10^{-4}$, 3– $5 \cdot 10^{-5}$.

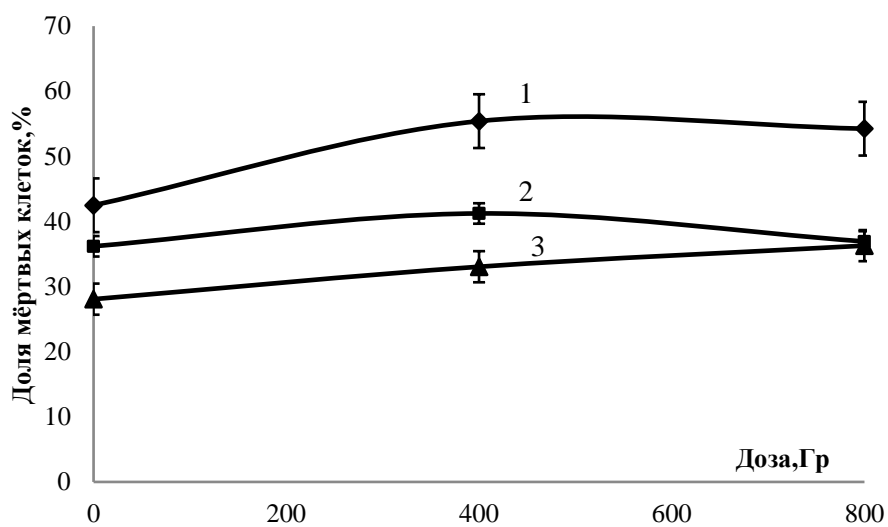


Рисунок 4.3.7 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 3 часа после облучения. 1– контроль, 2– $5 \cdot 10^{-4}$, 3– $5 \cdot 10^{-5}$

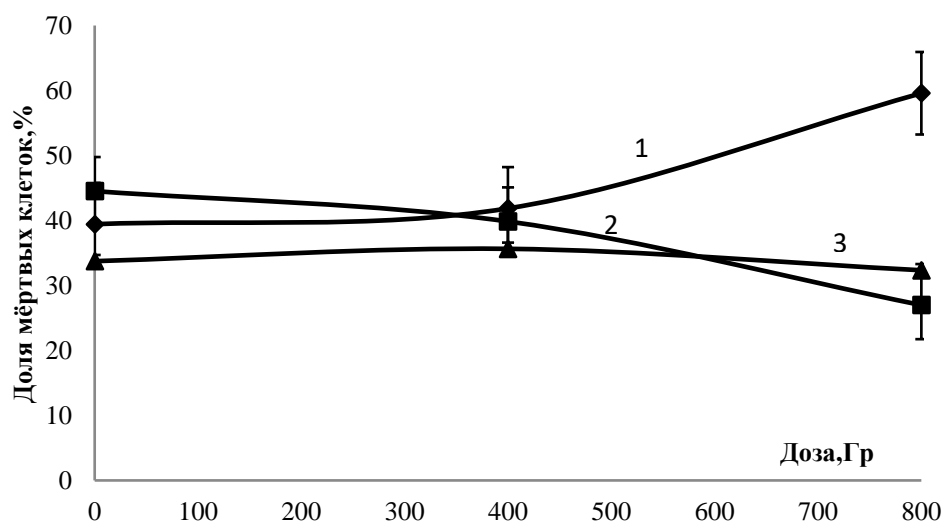


Рисунок 4.3.8 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 24 часа после облучения. 1– контроль, 2– $5 \cdot 10^{-4}$, 3– $5 \cdot 10^{-5}$

Таблица 4.3.7 – Биомасса (г/л) дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	4	3,06	3
10^{-4} моль/л	3,12	3,18	3
10^{-5} моль/л	2,94	2,82	3
Через 24 часа			
Контроль	3,24	3,42	3,24
10^{-4} моль/л	3,3	3,3	3,24
10^{-5} моль/л	3,18	3	3,12

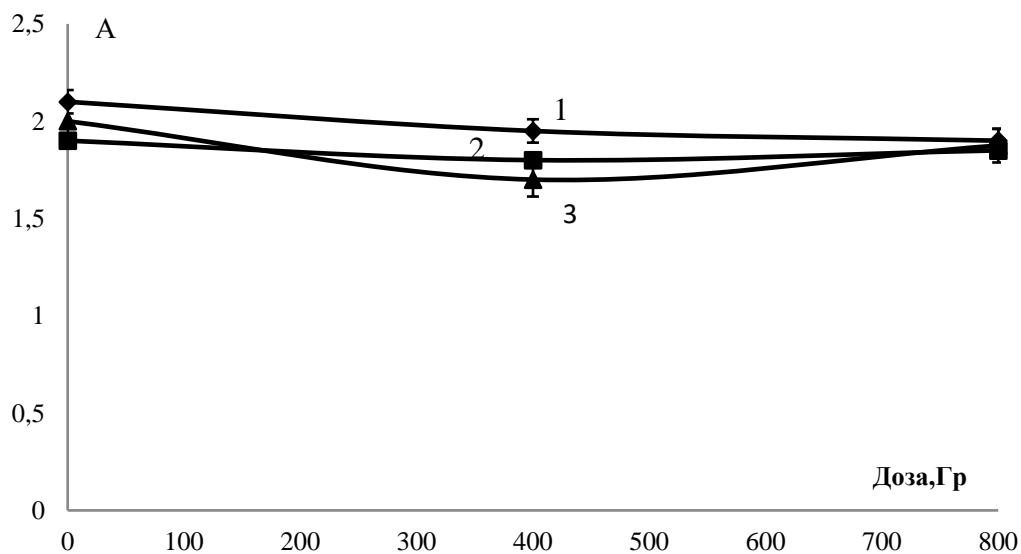
Пассаж 2:

Таблица 4.3.8 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2,1	1,95	1,9
10^{-4} моль/л	1,9	1,8	1,85
10^{-5} моль/л	2	1,7	1,875
Через 24 часа			
Контроль	2,3	2,4	2,3
10^{-4} моль/л	2,35	2,5	2,25
10^{-5} моль/л	2,55	2,2	2,35

Таблица. 4.3.9 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	27%	30%	33%
10^{-4} моль/л	46%	35%	39%
10^{-5} моль/л	35%	38%	41%
Через 24 часа			
Контроль	23%	23%	28%
10^{-4} моль/л	25%	34%	30%
10^{-5} моль/л	27%	27%	31%

Рисунок 4.3.9 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей от полученной дозы через 3 часа после облучения. 1– контроль, 2– $5 \cdot 10^{-4}$, 3– $5 \cdot 10^{-5}$.

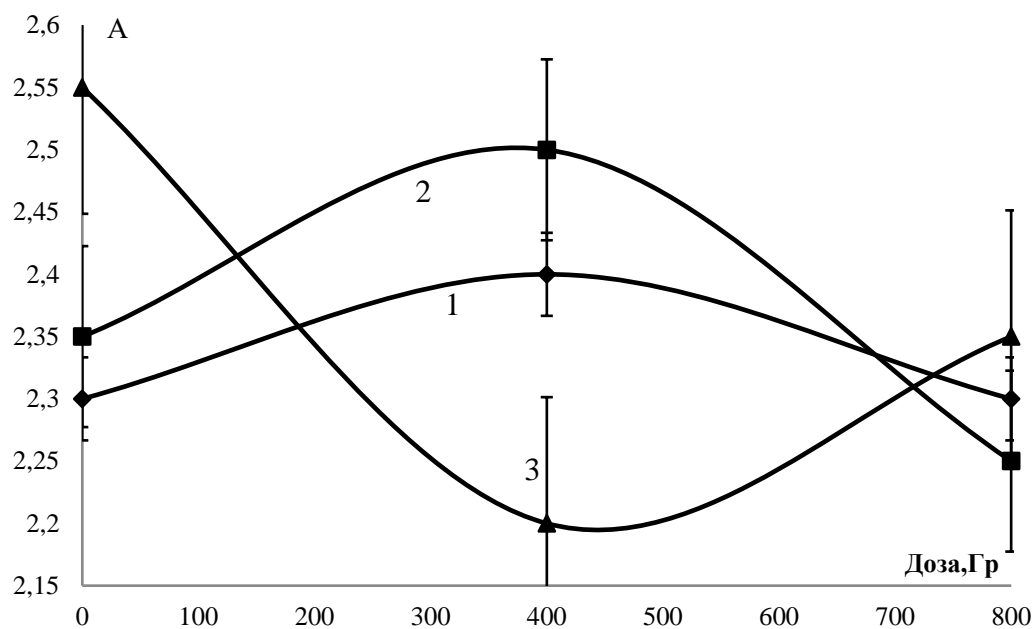


Рисунок 4.3.10 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей от полученной дозы через 24 часа после облучения. 1– контроль, 2– $5 \cdot 10^{-4}$, 3– $5 \cdot 10^{-5}$.

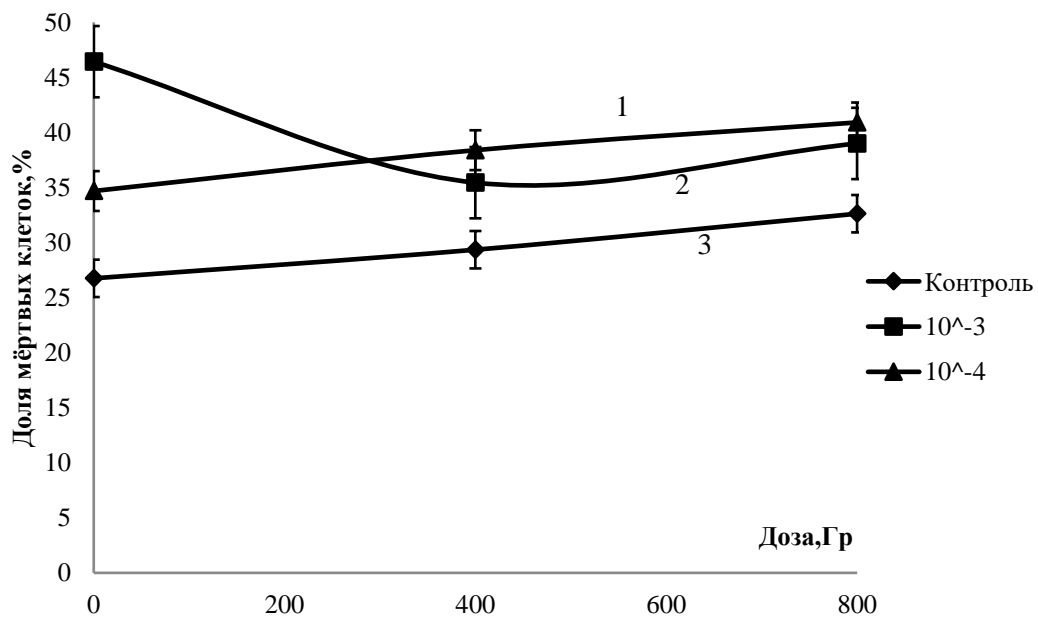


Рисунок 4.3.11 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 3 часа после облучения.

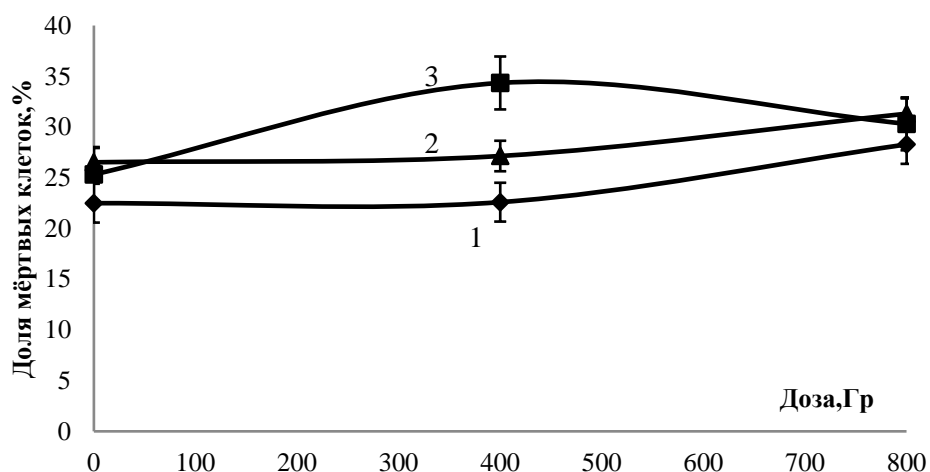


Рисунок 4.3.12 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 24 часа после облучения: 1– контроль, 2 – 10^{-5} , 3 – 10^{-4}

Таблица 4.3.10 – Биомасса (г/л) дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2,52	2,34	2,28
10^{-4} моль/л	2,28	2,16	2,22
10^{-5} моль/л	2,4	2,04	2,25
Через 24 часа			
Контроль	2,76	2,88	2,76
10^{-4} моль/л	2,82	3	2,7
10^{-5} моль/л	3,06	2,64	2,82

Таблица 4.3.11 – Биомасса (г/л) для отслеживания роста популяции сразу после пересева

Время, ч/Система	Контроль	0,1 мМ рутин (40% Et)	0,05 мМ рутин (40% Et)	40% Et
0	0,8	0,9	0,7	0,5
1	1,5	1,1	1,5	1,4
2	1,6	2,0	1,5	1,4
3	2,0	2,1	1,7	1,7
4	1,7	2,6	1,9	1,7

Для оценки адаптации дрожжевых клеток к стрессовым факторам (к добавлению пероксида водорода, рутина и ионола) измеряют оптическую плотность каждого пассажа и уже после того, как значения стабилизируются, приступают к облучению образцов.

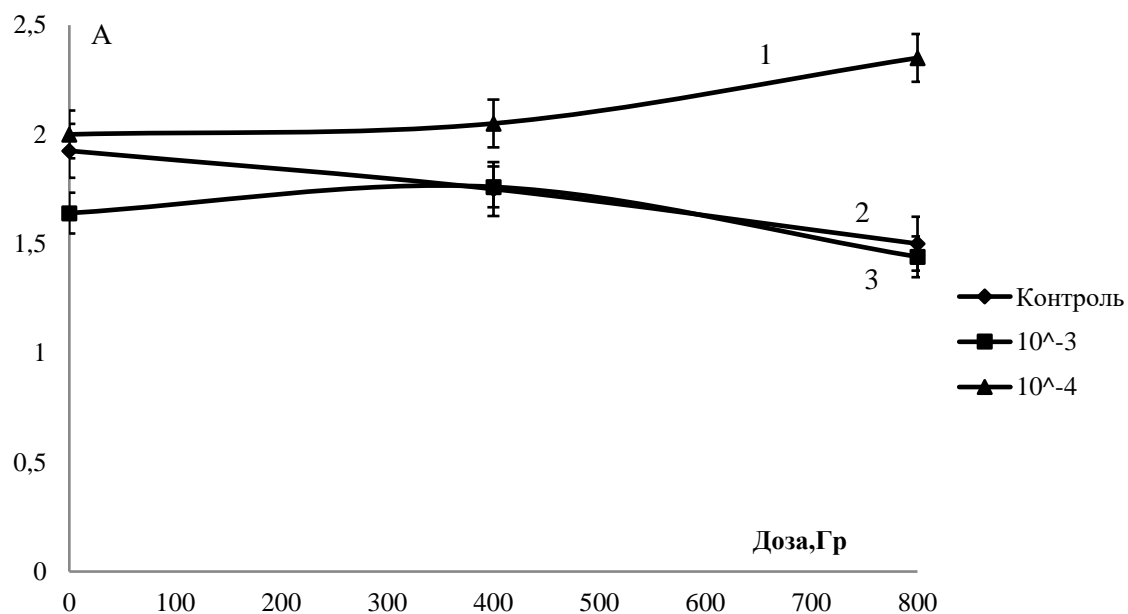
Аналогичные эксперименты были проведены с суспензиями дрожжей вида *S. carlsbergensis*:

Таблица 4.3.12 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	1,925	1,75	1,5
10^{-4} моль/л	1,64	1,76	1,44
10^{-5} моль/л	2	2,05	2,35
Через 24 часа			
Контроль	2,4	2,2	2
10^{-4} моль/л	2,5	2,2	2,25
10^{-5} моль/л	2,6	2,5	2,1

Таблица 4.3.13 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	28%	36%	40%
10^{-4} моль/л	32%	33%	37%
10^{-5} моль/л	35%	32%	35%
Через 24 часа			
Контроль	31%	36%	33%
10^{-4} моль/л	34%	37%	38%
10^{-5} моль/л	29%	35%	30%

Рисунок 4.3.13 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* от полученной дозы через 3 часа после облучения.

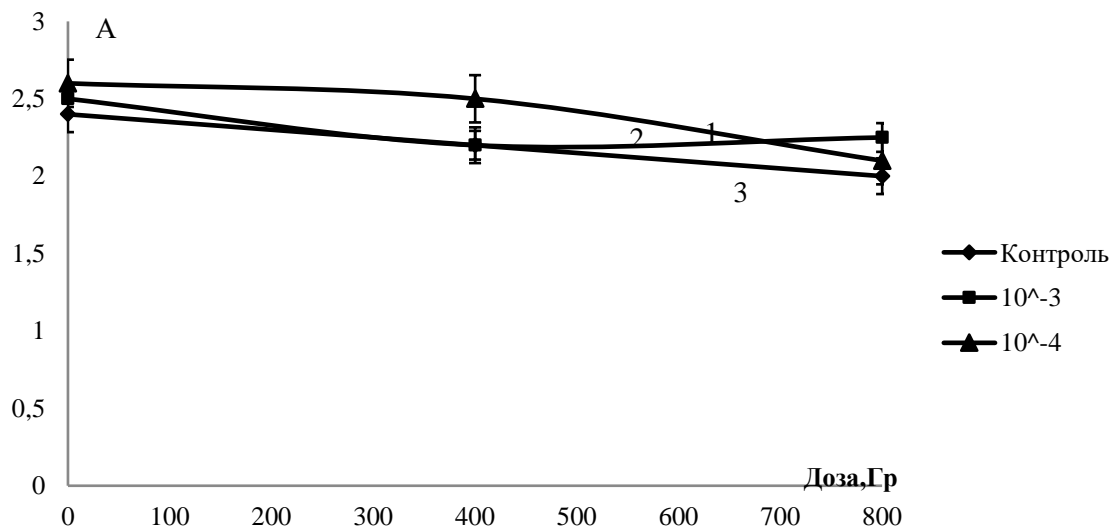


Рисунок 4.3.14– Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* от полученной дозы через 24 часа после облучения.

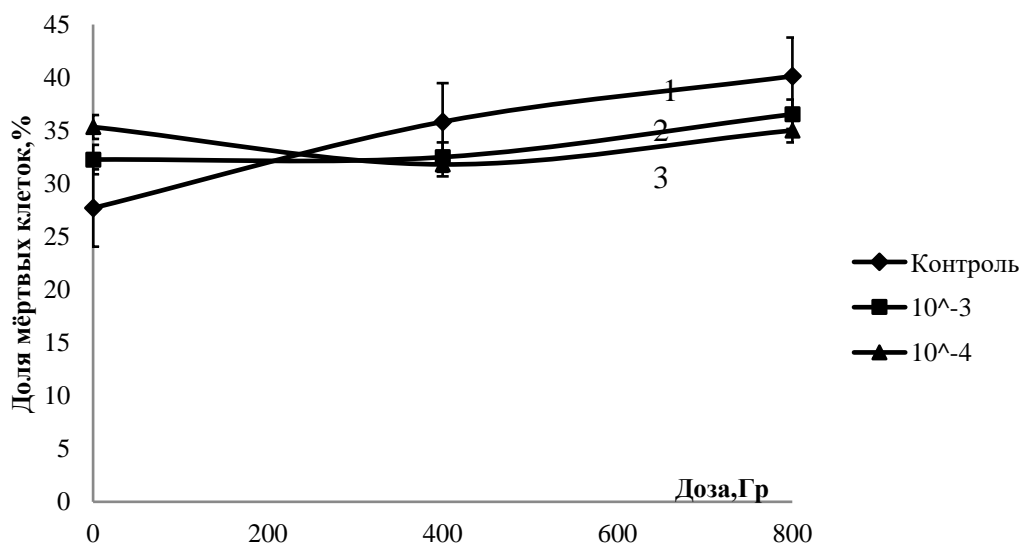


Рисунок 4.3.15 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* от поглощённой дозы через 3 часа после облучения

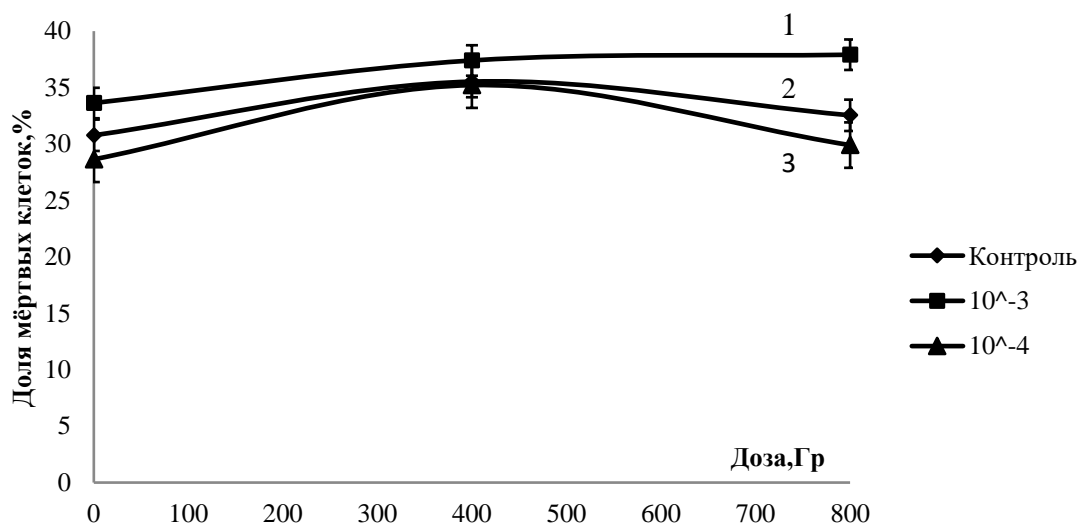


Рисунок 4.3.16 – Зависимость доли мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* от поглощённой дозы через 24 часа после облучения

Таблица 4.3.14 – Биомасса (г/л) дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2,31	2,1	1,8
10 ⁻⁴ моль/л	1,97	2,11	1,73
10 ⁻⁵ моль/л	2,4	2,46	2,82
Через 24 часа			
Контроль	2,88	2,64	2,4
10 ⁻⁴ моль/л	3	2,64	2,7
10 ⁻⁵ моль/л	3,12	3	2,52

Таблица 4.3.15 – Значение КОЕ *S. cerevisiae* в 1 мл суспензии после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 2 суток			
Контроль	29,2·10 ⁶	1887,4·10 ⁶	2022,2·10 ⁶
1 mM рутин (40% Et)	21,5·10 ⁶	8,1 ·10 ⁶	41,7·10 ⁶
0,1 mM рутин (40% Et)	131,6·10 ⁶	131,6·10 ⁶	131,6·10 ⁶
Через 3 суток			
Контроль	29,1·10 ⁶	1316,4·10 ⁶	1609,4·10 ⁶
1 mM рутин (40% Et)	10000·10 ⁶	11,6·10 ⁶	8,2·10 ⁶
0,1 mM рутин (40% Et)	13,1·10 ⁶	146,5·10 ⁶	100·10 ⁶

Таблица 4.3.16 – Значение КОЕ *S. cerevisiae* в 1 мл суспензии после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 2 суток			
Контроль	15,2·10 ⁶	972,8·10 ⁶	1042,3·10 ⁶
1 mM рутин (40% Et)	11,1·10 ⁶	4,2·10 ⁶	21,4·10 ⁶
0,1 mM рутин(40% Et)	67,8·10 ⁶	67,8·10 ⁶	67,8·10 ⁶
Через 3 суток			
Контроль	15,2·10 ⁶	678,6 ·10 ⁶	829,6·10 ⁶
1 mM рутин (40% Et)	5154,6·10 ⁶	5,9·10 ⁶	4,2·10 ⁶
0,1 mM рутин(40% Et)	6,7·10 ⁶	75,5·10 ⁶	51,5·10 ⁶

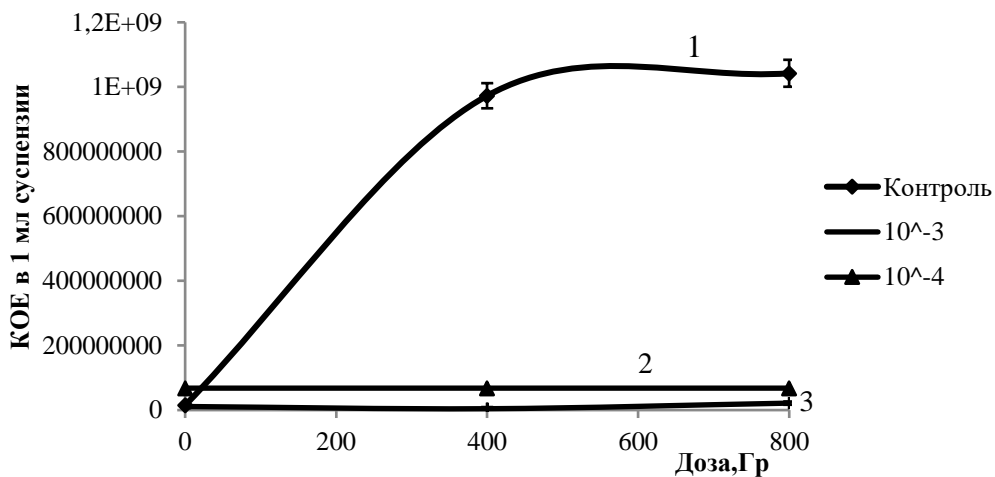


Рисунок 4.3.17 – Зависимости КОЕ в 1 мл суспензии микроорганизмов *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 2 суток после облучения

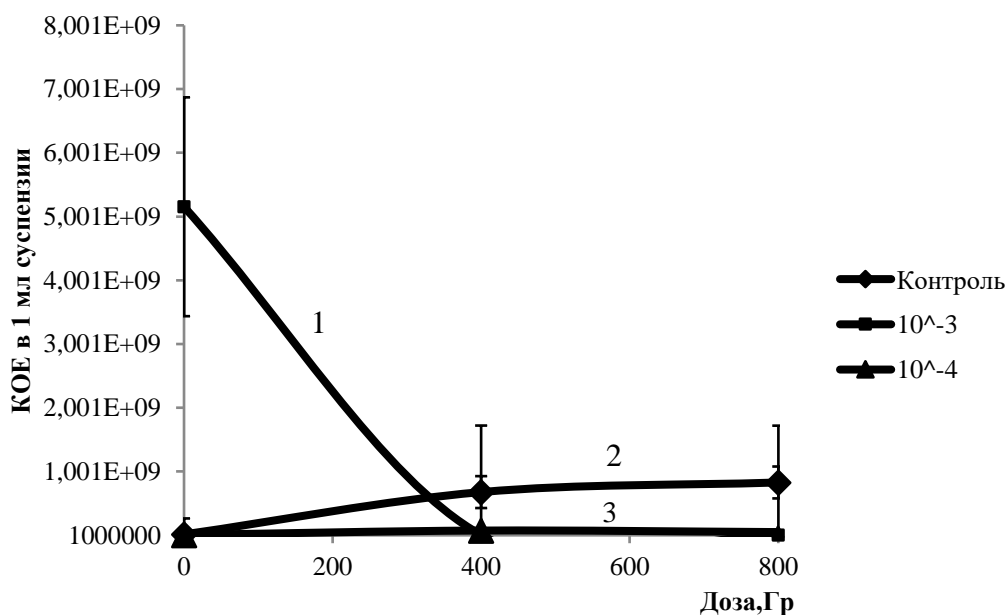


Рисунок 4.3.18 – Зависимости КОЕ в 1 мл суспензии микроорганизмов вида *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 3 суток после облучения

На рисунке 4.3.18 показано количество колониеобразующих единиц дрожжей вида *S. cerevisiae* в 1 мл суспензии через 3 суток после облучения в зависимости от дозы рентгеновского облучения. В результате экспериментов показано, что добавление рутина с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л заметно увеличивает количество жизнеспособных клеток, способных к формированию колоний, чем добавление рутина с концентрацией $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Значение КОЕ дрожжей вида *S. cerevisiae* с добавлением рутина при различной концентрации многократно уменьшается по отношению к контролю через 3 суток при дозе 400 Гр и 800 Гр рентгеновского облучения

Таблица 4.3.17 – Значение КОЕ дрожжей *S. carlsbergensis* в 1 мл суспензии после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 2 суток			
Контроль	0,444	0,003	0,0002
10^{-4} моль/л	0,0003	0,0001	0,00016
10^{-5} моль/л	0,0046	0,0003	0,0027
Через 3 суток			
Контроль	0,444	-	0,00024
10^{-4} моль/л	0,00029	-	0,00018
10^{-5} моль/л	0,0042	0,00029	0,003

Таблица 4.3.18 – Значение КОЕ дрожжей *S. carlsbergensis* в 1 мл суспензии после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 2 суток			
Контроль	0,229	0,0015	0,0001
10^{-4} моль/л	0,00015	0,00005	0,00008
10^{-5} моль/л	0,0024	0,00015	0,0014
Через 3 суток			
Контроль	0,229	-	0,00012
10^{-4} моль/л	0,00015	-	0,00009
10^{-5} моль/л	0,0022	0,00015	0,0015

4.3.2 Влияние раствора ионола на выживаемость дрожжей до и после облучения

Экспериментальные данные по оценке выживаемости дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* до и после облучения при добавлении спиртовых растворов ионола приведены в таблицах 4.3.19 – 4.3.23 и рисунках 4.3.19 – 4.3.22.

Поскольку ионол нерастворим в воде, был приготовлен спиртовой раствор (70% этанола) этого соединения. В проведенных экспериментах было использовано два раствора ионола с концентрациями $5 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-3}$ для того, чтобы изучить зависимость выживания дрожжей от концентрации антиоксиданта.

Дрожжи вида *S. cerevisiae*:Таблица 4.3.19 – Оптическая плотность (А) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2,05	2,25	2,3
$5 \cdot 10^{-4}$ М	1,65	1,39	1,5
$5 \cdot 10^{-3}$ М	1,73	1,47	1,69
Через 24 часа			
Контроль	2,5	2,45	2,8
$5 \cdot 10^{-4}$ М	1,85	2,15	2,4
$5 \cdot 10^{-3}$ М	1,8	2,05	2,25

Таблица 4.3.20 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* после облучения

<i>S. cerevisiae</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	17 %	40 %	43 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	12 %	14 %	16 %
$5 \cdot 10^{-3}$ М	14 %	29 %	38 %
Через 24 часа			
Контроль	15 %	23 %	20 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	20 %	11 %	12 %
$5 \cdot 10^{-3}$ М	18 %	15 %	16 %

Экспериментальные данные по выживаемости клеток дрожжей вида *S. carlsbergensis* приведены ниже.

Таблица 4.3.21 – Оптическая плотность (A) суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	2,1	1,9	1,65
$5 \cdot 10^{-4}$ М	1,65	0,95	1,0
$5 \cdot 10^{-3}$ М	1,0	0,4	0,27
Через 24 часа			
Контроль	2,35	2,5	2,4
$5 \cdot 10^{-4}$ М	1,9	2,25	2,0
$5 \cdot 10^{-3}$ М	1,9	2,15	2,1

Таблица 4.3.22 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. carlsbergensis* после облучения

<i>S. carlsbergensis</i>	0 Гр	400 Гр	800 Гр
Через 3 часа			
Контроль	18 %	26 %	31 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	17 %	24 %	23 %
$5 \cdot 10^{-3}$ М	19 %	24 %	26 %
Через 24 часа			
Контроль	39 %	36 %	28 %
$5 \cdot 10^{-4}$ М	23 %	31 %	24 %
$5 \cdot 10^{-3}$ М	9 %	26 %	19 %

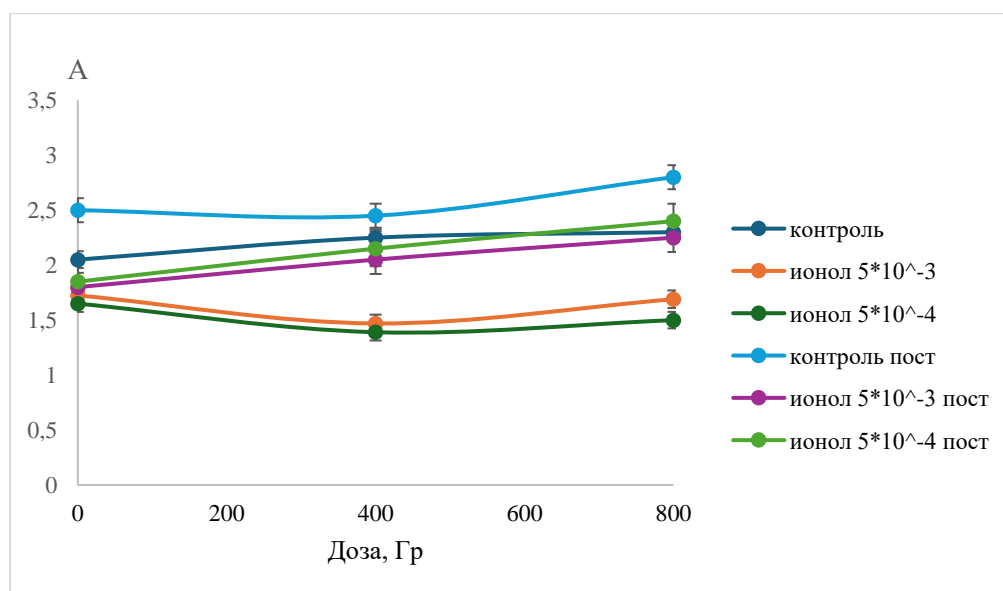


Рисунок 4.3.19 – Оптическая плотность (A) суспензии дрожжей *S. cerevisiae* в зависимости от дозы до и после облучения

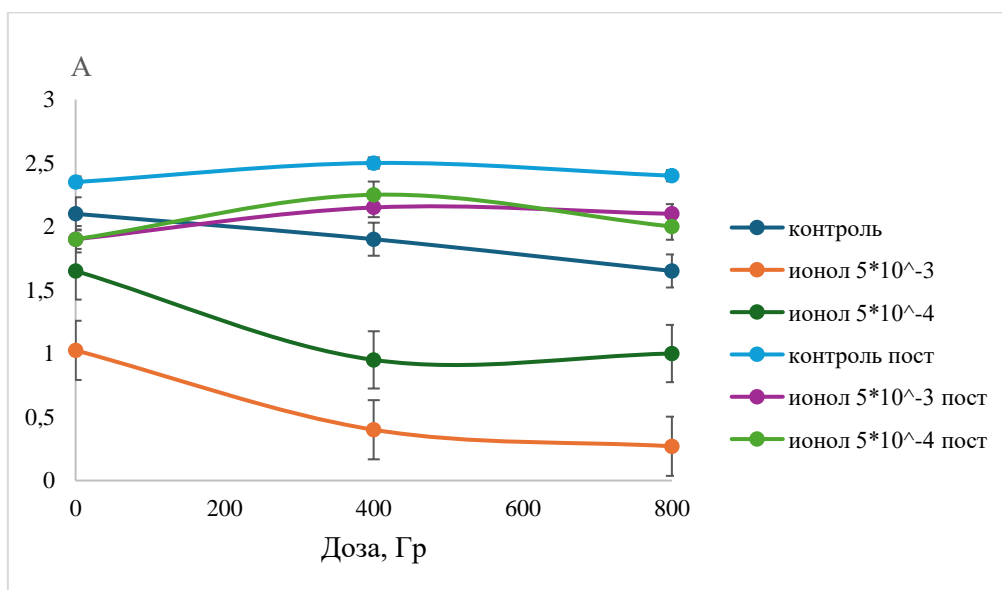


Рисунок 4.3.20 – Оптическая плотность (A) суспензии дрожжей *S. carlsbergensis* в зависимости от дозы до и после облучения

Известно, что введение синтетических антиоксидантов в питательную среду может увеличить выход биомассы, удельную скорость роста и улучшить качество биомассы. Однако при высоких концентрациях антиоксиданты обладают

антимикробной активностью. При периодическом методе культивирования дрожжей в лабораторном ферментере внесение оптимальных концентраций ионола $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ и $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ без облучения рентгеновским излучением позволило повысить основные показатели качества дрожжей относительно контроля. Чтобы оценить влияние ионола на выживаемость клеток дрожжей, были проведены эксперименты на дрожжевых суспензиях с добавлением дрожжевых клеток в суспензию с добавлением ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) и ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) и без добавления ионола. Можно видеть (рис. 4.3.19 и 4.3.20), что накопление биомассы дрожжей *S. cerevisiae* при дозе 800 Гр увеличивается по сравнению с дозами 400 Гр (кривые 6 и 7). Накопление биомассы дрожжей *S. carlsbergensis* через 3 часа при дозах 400 и 800 Гр уменьшается по сравнению с контролем, а через 24 часа при дозах 400 и 800 Гр, в частности, не изменяется по сравнению с контролем на рисунке 4.3.19 и 4.3.20. [210].

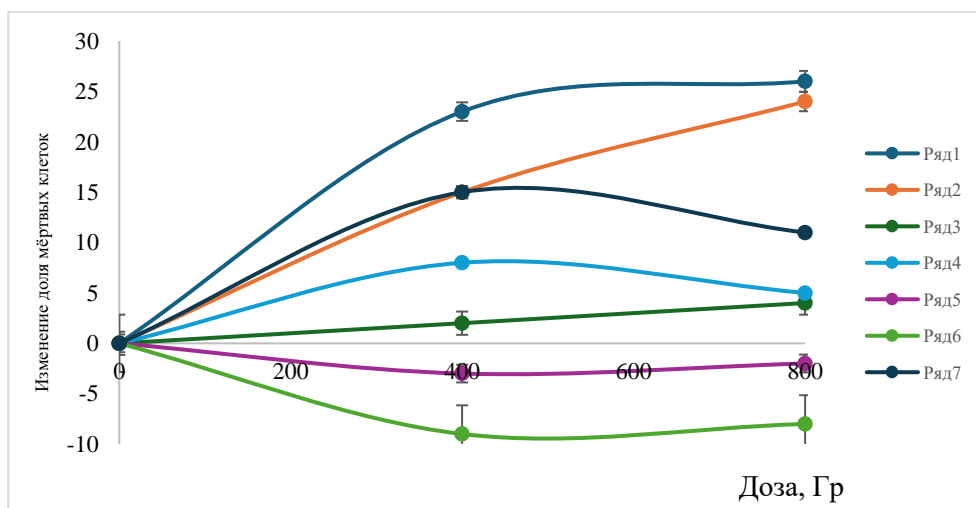


Рисунок 4.3.21 – Изменение дрожжей *S. cerevisiae* дрожжевых клеток от дозы облучения во время культивирования: 1 – контроль, 2 – ионол ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), 3 - H_2O_2 , 4 – контроль (пост - эффект), 5 – ионол ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), 6 – ионол ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) пост - эффект, 7 – ионол ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) пост - эффект

На рисунке 4.3.22 показано изменение доли погибших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* до и после облучения дозой 400 Гр и 800 Гр при внесении в суспензию клеток раствора ионола разных концентраций. Было показано, что доля мертвых клеток уменьшается после 24-часового облучения. Кроме того, добавление ионола ($5 \cdot 10^{-3}$ М и $5 \cdot 10^{-4}$ М) понижает количество погибших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в постлучевой период [212], равный 24 часам после облучения, в 3 и 4 раза, по сравнению с контрольным образцом.

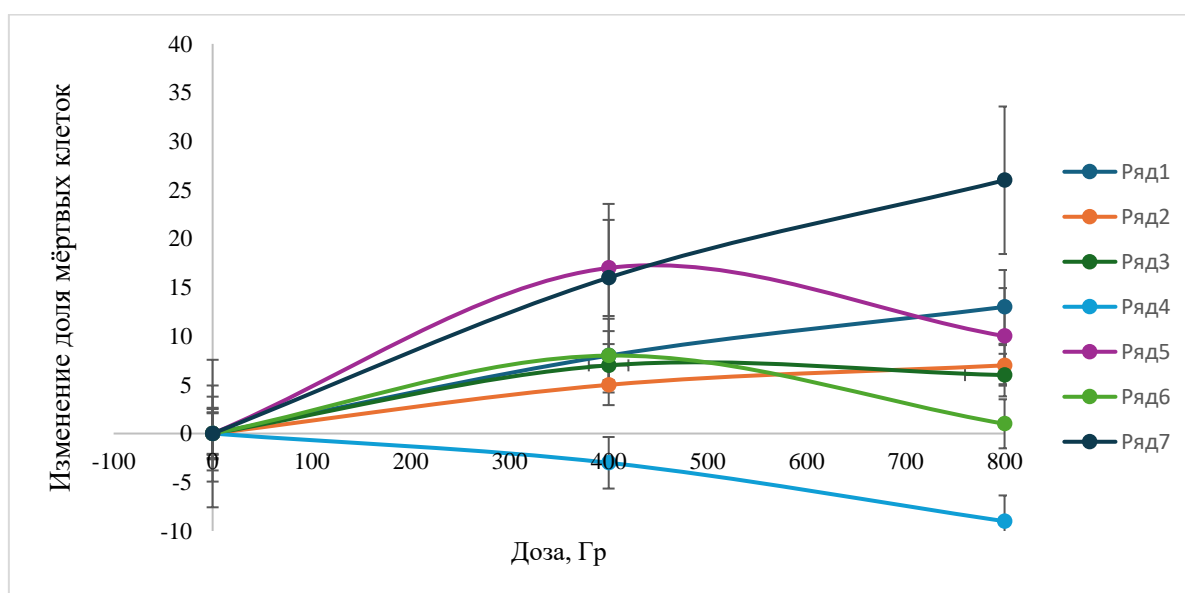


Рисунок 4.3.22 – Изменение клеток дрожжей *S. cerevisiae* от дозы облучения во время культивирования: 1 – контроль, 2 – ионол ($5 \cdot 10^{-3}$ М), 3 – ионол ($5 \cdot 10^{-4}$ М), 4 – контроль (пост - эффект), 5 – ионол ($5 \cdot 10^{-3}$ М) пост - эффект, 6 – ионол ($5 \cdot 10^{-4}$ М) пост - эффект, 7 – H_2O_2

Для определения эффекта внесения ионола вначале были проведены тесты с добавлением в суспензию дрожжевых клеток (5 мМ) и (0,5 мМ) ионола и без его добавления ионола. Было установлено, что облучение заметно влияет на выживаемость дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в суспензии без внесения ионола: доля погибших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* составляет 17% до облучения, 40%

при дозе 400 Гр и 43% при дозе 800 Гр. Было показано, что введение известного антиоксидантного раствора этанол-ионол с концентрацией 5 мМ и 0,5 мМ приводило к заметному увеличению выживаемости клеток в постлучевой период. Так, через 3 часа жизнеспособность дрожжевых клеток увеличивалась почти в 3 раза, через 24 часа она немного снизилась, но клеточная жизнеспособность была в 2 раза выше, чем в контрольной группе. Было показано, что накопление биомассы дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* при дозировке 800 Гр увеличивается по сравнению с дозами 400 Гр. А рост дрожжей в постлучевой период увеличивается по сравнению с данными о выживаемости клеток, полученными после 3-часового облучения. Аналогичные эксперименты, проведенные с дрожжами *S. carlsbergensis* показали, что доля погибших дрожжевых клеток *S. carlsbergensis* составляет 18% до облучения, 26% при дозе 400 Гр и 31% при дозе 800 Гр. Введение антиоксидантного раствора этанол-ионол с концентрацией 5 мМ и 0,5 мМ привело к увеличению выживаемости клеток в постлучевой период.

Таблица 4.3.23 – Доля мертвых клеток дрожжей через 3 и 24 часа после облучения

Доза, Гр	Контроль(3 часа),%	0,05 мМ ионол(70% Et) (3 часа), %	0,05 мМ ионол(70% Et)+35% H ₂ O ₂ (3 часа), %	Контроль(24 часа),%	0,05 мМ ионол(70% Et) (24 часа), %	0,05 мМ ионол(70% Et)+35% H ₂ O ₂ (24 часа), %
0	14,3	16,0	14,0	20,5	19,0	15,4
400	21,1	18,5	31,1	26,5	17,8	25,2
800	16,0	18,1	26,8	26,5	23,6	21,0
2000	23,2	22,8	15,9	22,7	23,9	28,3

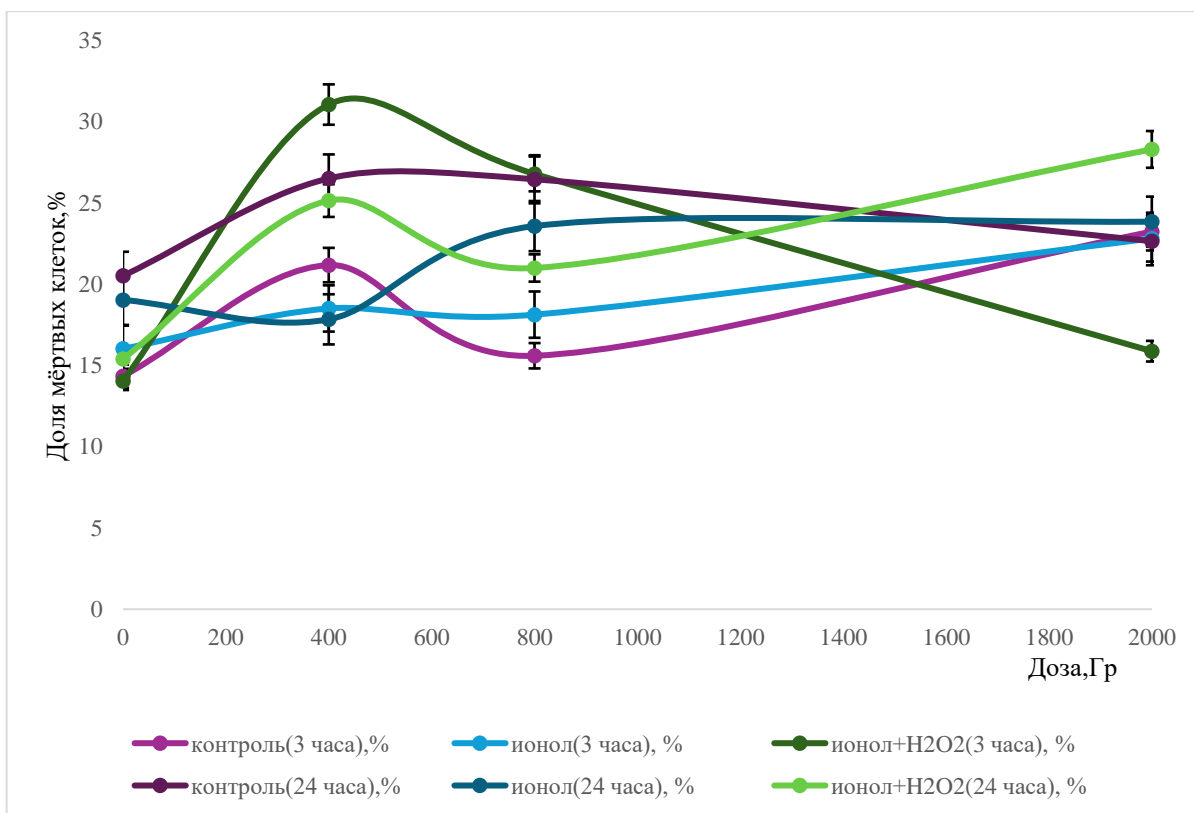
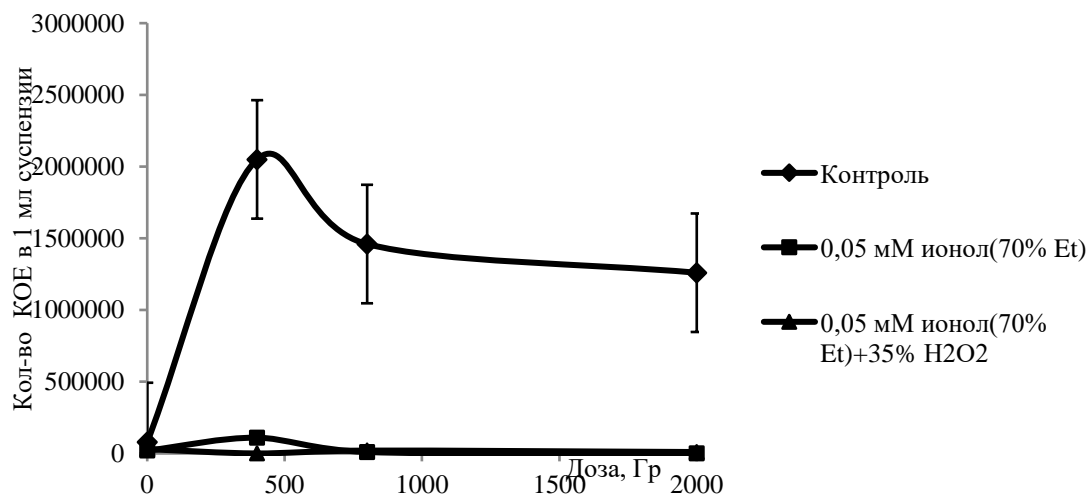


Рисунок 4.3.23. Доля мёртвых клеток с добавлением ионола 0,05mM в 70% растворе этанола и пероксида водорода

На рис. 4.3.23 представлены результаты экспериментов с ионолом, в качестве радиопротектора. Исходя из графика можно сделать выводы о том, что ионол благоприятно воздействует на выживаемость и репарационные процессы в дрожжевых клетках. А добавление пероксида водорода существенно уменьшает выживаемость клеток сразу после облучения, но способствует протеканию репарационных процессов.

Таблица 4.3.24 – Значение КОЕ в 1 мл суспензии после облучения систем

Система/Доза (Гр)	0	400	800	2000
Через 4 дня				
Контроль	$26,7 \cdot 10^6$	$683,3 \cdot 10^6$	$486,7 \cdot 10^6$	$420 \cdot 10^6$
0,05 мМ ионол (70% Et)	$6,7 \cdot 10^6$	$36,7 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	0
0,05 мМ ионол (70% Et)+35% H ₂ O ₂	$10 \cdot 10^6$	0	$6,7 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$
Через 7 дней				
Контроль	$30 \cdot 10^6$	$1020 \cdot 10^6$	$82 \cdot 10^6$	$3753,3 \cdot 10^6$
0,05 мМ ионол (70% Et)	$6,7 \cdot 10^6$	$73,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	0
0,05 мМ ионол (70% Et)+35% H ₂ O ₂	$10 \cdot 10^6$	0	$6,7 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$

Рисунок 4.3.24– Зависимость КОЕ в 1 мл суспензии микроорганизмов вида *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 4 суток после облучении

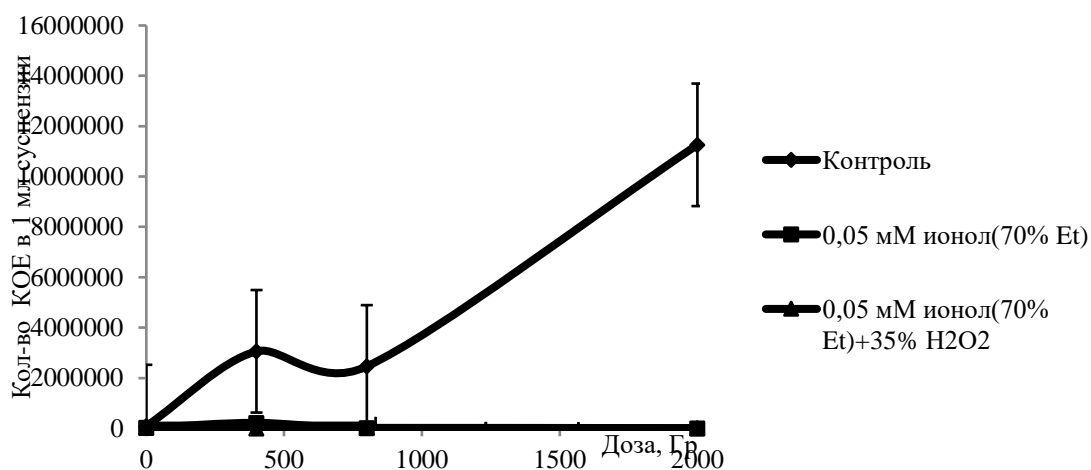


Рисунок 4.3.25 –Зависимости КОЕ в 1 мл суспензии микроорганизмов вида *S. cerevisiae* от поглощённой дозы через 7 суток после облучения

4.3.3 Влияние рутина с концентрацией (10^{-4} моль/л) и (10^{-5} моль/л) в 70% растворе этанола на выживаемость дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* в присутствии перекиси водорода

Экспериментальные данные по оценке влияния добавления спиртовых растворов рутина с концентрацией (10^{-4} г/л) и (10^{-5} г/л) на выживаемость дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis* в присутствии пероксида водорода представлены ниже.

Таблица 4.3.25 – Данные оптической плотности для эксперимента дрожжей *S. cerevisiae* с добавлением рутина в различных концентрациях в присутствии перекиси водорода

Система/Пассаж	1	2	3	4	5	6
Контроль	1,55	2,05	2,2	2,23	2,6	2,25
0,05 мМ рутин(70% Et)	1,45	1,6	1,8	1,7	2,4	1,7
0,05 мМ рутин(70% Et)+35% H ₂ O ₂	1,85	1,19	1,7	1,4	2,2	1,6

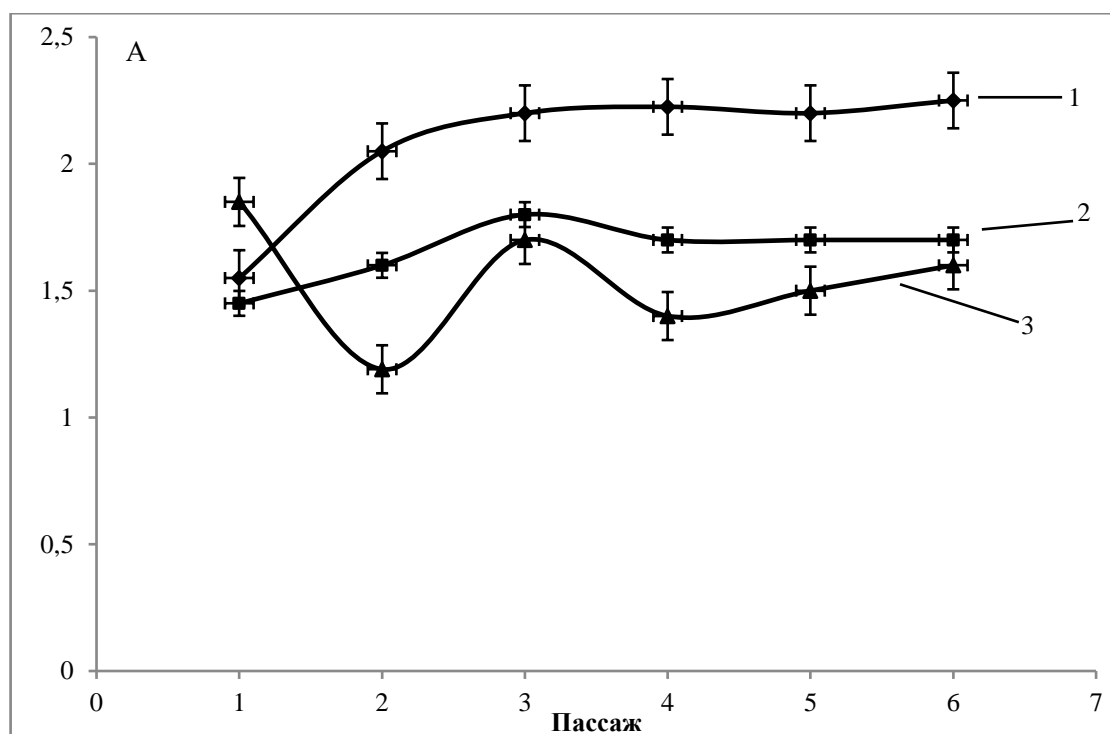


Рисунок 4.3.26 – Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей от пассажа, 1– контроль, 2–0,05 мМ рутин (70%Et), 3– 0,05 мМ рутин (70%Et)+ 35%Н₂О₂

Таблица 4.3.26 – Данные оптической плотности суспензии дрожжей после облучения

Система/Доза (Гр)	0	400	800	2000
Контроль	1,5	1,4	1,2	1
0,05 мМ рутин (70% Et)	0,75	0,6	0,75	0,75
0,05 мМ рутин (70% Et)+35% Н ₂ О ₂	0,5	0,55	0,4	0,4

Таблица 4.3.27 – Зависимость доли мёртвых клеток от дозы облучения через 3 и 24 часа

Доза, Гр	Контроль (3 часа), %	0,05 мМ рутин (70% Et) (3 часа), %	0,05 мМ рутин(70% Et)+35% H ₂ O ₂ (3 часа), %	Контроль (24 часа), %	0,05 мМ рутин (70% Et) (24 часа), %	0,05 мМ рутин(70% Et)+35% H ₂ O ₂ (24 часа), %
0	17,2	14	20,4	12,7	10,9	15,3
400	17,5	8,95	8,9	10,7	15,5	17,7
800	36,6	12,13	29,55	15,9	16,7	18,2
2000	21,	19,8	19,1	15,3	13,5	24

Таблица 4.3.28 – Значения доли мёртвых клеток через 3 и 24 часа после отбора без добавления рутина

Номер пробирки	Доля мёртвых клеток через 3 часа, %	Доля мёртвых клеток через 24 часа, %
1	11	11,1
2	21,7	19,5
3	14	25,4
4	22,3	28,2

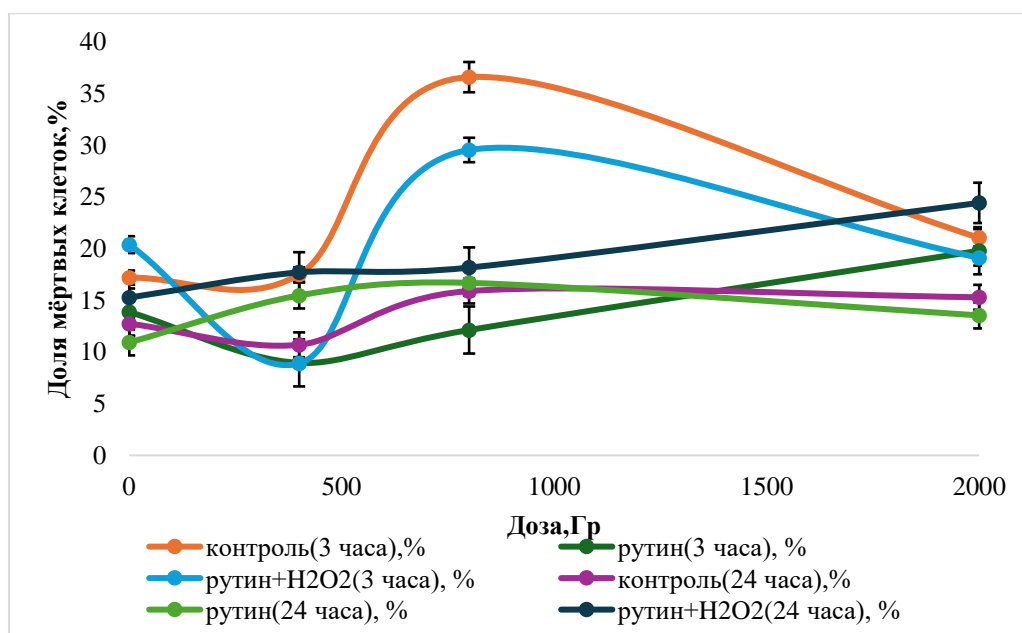


Рисунок 4.3.27 – Доля мёртвых клеток с добавлением рутина 0,05mM в 70% растворе этанола и пероксида водорода

На рис. 4.3.27 представлены данные эксперимента с добавлением 0,05mM рутина уже в 70% растворе этанола, а также при добавлении в систему 35% активной формы кислорода-перекиси водорода. На графике можно увидеть, что процент мёртвых клеток систем с добавлением рутина и перекиси водорода ниже, чем с системами только дрожжевых клеток сразу после облучения. Но репарационные процессы в системах с добавленными веществами идут хуже. Сравнивая между собой результаты системы с 0,05mM рутина и системы с добавлением к нему пероксида водорода можно сделать вывод, что защитные свойства комплексной системы заметно ниже, чем при добавлении рутина.

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И СЕРЕБРА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ИЗУЧАЕМЫХ ЭКСТРАКТОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОДЕЛЬНЫМИ БИООБЪЕКТАМИ

Известно, что наночастицы металлов находят все большее применение в различных отраслях народного хозяйства: медицинской, косметической, текстильной, агропромышленности и др [218]. В медицинской отрасли наибольший интерес представляют наночастицы серебра, которые благодаря своим свойствам успешно используются для новых антимикробных агентов, лекарственных форм для доставки, платформ для обнаружения и диагностики [218].

Задачами данного исследования являлись синтез и оценка радиопротекторных свойств наночастиц серебра по технологии «Зеленого» синтеза наночастиц серебра с использованием экстрактов растений, а также изучение их влияния на дрожжи *S. cerevisiae*, широко используемые как модель в различных биологических исследованиях. L-AgNP биосинтезировали из водного экстракта листьев растений и оценивали способность биологически активных компонентов экстракта выступать в роли биокатализаторов восстановления ионов серебра до серебра.

В данной работе рассматривались возможности использования экстрактов багульника болотного, муррайи и каркаде в синтезе наночастиц серебра и селена, а также. изучение радиопротекторных свойств полученных наносuspензий.

5.1 Влияние экстрактов лекарственных растений в присутствии наночастиц серебра на выживаемость клеток *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*

5.1.1 Влияние наночастиц серебра с концентрациями (10^{-3} и 10^{-4} М) на выживаемость клеток *S. cerevisiae* после облучения

Для оценки выживаемости клеток *S. cerevisiae* до и после облучения при внесении суспензий наночастиц серебра разного размера нами были проведены измерения динамики роста клеток дрожжей (оптической плотности суспензий) и доли мертвых клеток при аэрировании и в анаэробных условиях

Таблица 5.1.1 – Динамика роста дрожжей *S. cerevisiae* при внесении AgNO_3 (состав 1)

ОП	0ч	1ч	24ч	48ч	3сутки
контроль	0,68	0,7	3	2,9	3,3
$4 \cdot 10^{-5}$ М AgNO_3	0,43	0,53	2,4	2,85	2,9
$1 \cdot 10^{-4}$ М AgNO_3	0,65	0,56	2,05	2,45	2,78
$4 \cdot 10^{-6}$ М AgNO_3	0,65	0,66	2,9	2,9	3,35
$1 \cdot 10^{-5}$ М AgNO_3	0,35	0,35	3	2,9	2,75

Таблица 5.1.2 – Динамика роста дрожжей *S. cerevisiae* при внесении AgNO_3 (10^{-3} и 10^{-4} М) (состав 2)

ОП	2 сутки	4 сутки	7 суток
контроль	2,3	2,45	2,3
$4 \cdot 10^{-5}$ М AgNO_3	2,1	2	2,45
$1 \cdot 10^{-4}$ М AgNO_3	0,95	0,3	1,85
$4 \cdot 10^{-6}$ М AgNO_3	2,2	2,2	2,3
$1 \cdot 10^{-5}$ М AgNO_3	2,25	2,45	2,3

Таблица 5.1.3 – Оптическая плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* разных пассажей при внесении AgNO_3 (10^{-3}M) (состав2)

ОП	1 пассаж		2 пассаж		3 пассаж		4 пассаж		5 пассаж	
	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч
контроль	1,63	1,85	1,78	1,8	1,63	1,85	1,78	1,8	0,55	1,4
$1 \cdot 10^{-3}\text{M}$ AgNO_3	1,55	1,75	1,5	1,9	1,55	1,75	1,5	1,9	0,43	0,4
$2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ AgNO_3	1,25	1,6	1,55	1,53	1,25	1,6	1,55	1,53	0,35	0,4
$3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ AgNO_3	0,9	1,6	1,55	1,45	0,9	1,6	1,55	1,45	0,3	0,43
$4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ AgNO_3	0,33	0,33	0,33	0,3	0,33	0,33	0,33	0,3	0,33	0,35
$5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ AgNO_3	0,35	0,32	0,4	0,24	0,35	0,32	0,4	0,24	0,33	0,38

В таблице 5.1.3. показано, что при увеличении концентрации AgNO_3 (от 1×10^{-3} М до 5×10^{-3} М) наблюдается снижение оптической плотности раствора *S. cerevisiae* как через 24 часа, так и через 48 часов после облучения. Это указывает на подавление роста дрожжей под действием нитрата серебра. Через 48 часов антимикробный эффект AgNO_3 выражен сильнее, чем через 24 часа, особенно при более высоких концентрациях выше 3×10^{-3} М. Это может быть связано с кумулятивным действием серебра или усилением его токсичности при длительном контакте. Облучение, вероятно, потенцирует действие AgNO_3 , что приводит к более значительному снижению оптической плотности и как следствие, снижению выживаемости дрожжевых клеток.

Таблица 5.1.4 – Оптическая плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* в аэробных условиях без добавки AgNO_3 в зависимости от дозы

Доз	3ч	Пост-эффект (после 1 суток)
0	2,7	2,75
50	1,7	1,9
100	1,7	1,95
150	1,8	1,8
200	1,8	1,85
400	1,6	1,75
600	1,75	1,85
800	1,6	1,85
1000	1,7	2
2000	1,8	2,1

Таблица 5.1.5 – Доля мёртвых клеток суспензии дрожжей *S. cerevisiae* в аэробных условиях без добавки AgNO_3 в зависимости от дозы

Доз	3ч (%)	Пост-эффект (После 1 суток)(%)
0	10	15
50	14	22
100	16	19
150	22	20
200	30	31
400	34	33
600	38	35
800	45	43
1000	65	59
2000	94	91

Таблица 5.1.6 – Оптическая плотность дрожжей *S. cerevisiae* в анаэробных условиях без добавки AgNO_3 в зависимости от дозы

Доз	3ч	Пост-эффект (После 1 суток)
0	2,1	2,6
50	2,3	2,8
100	2,7	2,85
150	2,4	2,95
200	2,5	2,95
400	2,5	2,55
600	2,2	3,1
800	2,65	3,1
1000	2,3	2,8
2000	2,4	2,8
4000	2,4	2,7

Таблица 5.1.7 – Доля мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* в анаэробных условиях без добавки AgNO_3 в зависимости от дозы

Доз	3ч (%)	Пост-эффект (После 1 суток)(%)
0	25	10
50	31	29
100	33	30
150	41	34
200	45	37
400	47	40
600	51	42
800	56	45
1000	57	49
2000	89	78
4000	91	86

Таблица 5.1.8 – Оптическая плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* в аэробных условиях с внесением AgNO_3 (10^{-2} и 10^{-3}M) в зависимости от дозы

Дозы	3ч (10^{-3}M , AgNO_3)	после 1 суток (10^{-3}M , AgNO_3)	3ч (10^{-2}M , AgNO_3)	после 1 суток (10^{-2}M , AgNO_3)
0	1,3	1,5	0,15	0,23
50	1,33	1,6	0,23	0,18
100	1,45	1,65	0,23	0,2
150	1,4	1,6	0,15	0,18
200	1,45	1,6	0,18	0,24
400	1,38	1,6	0,23	0,23
600	1,4	1,62	0,15	0,2
800	1,4	1,6	0,18	0,15
1000	1,35	1,5	0,2	0,24
2000	1,35	1,6	0,13	0,18
4000	1,38	1,55	0,18	0,25

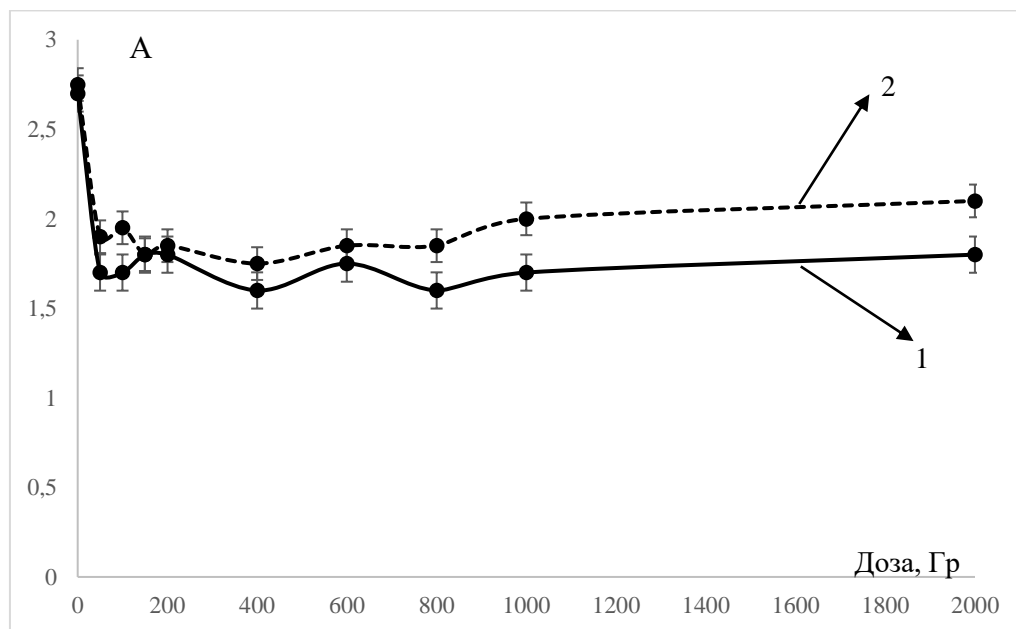


Рисунок 5.1.1 – Оптическая плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* штаммом Т 985 без добавки AgNO_3 в аэробных условиях в зависимости от дозы :1– 3 часа после облучения, 2– 24 часа после облучения

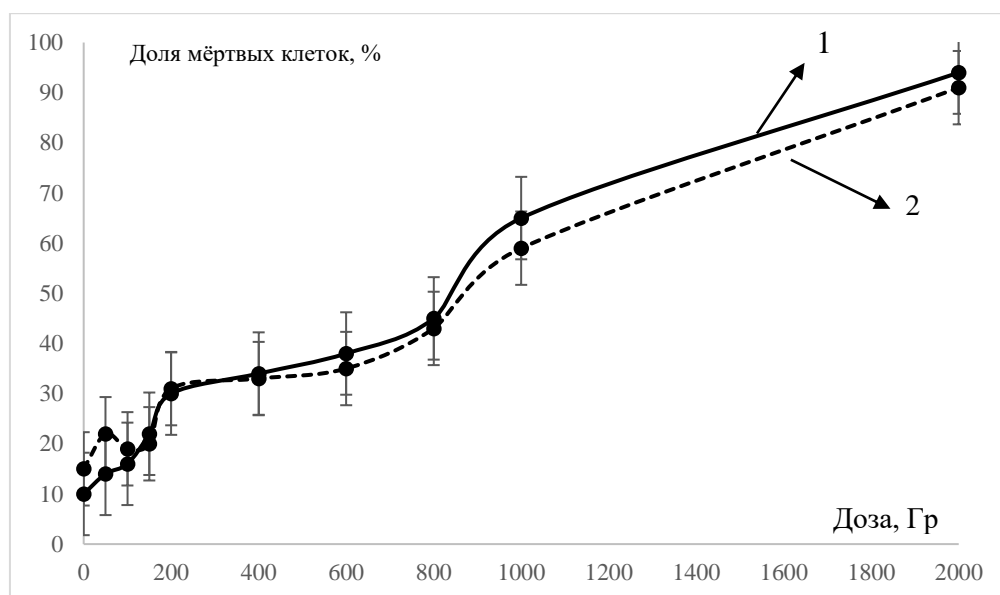


Рисунок 5.1.2 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей без добавки AgNO_3 в аэробных условиях, 1– 3 часа облучение, 2– 24 часа облучение

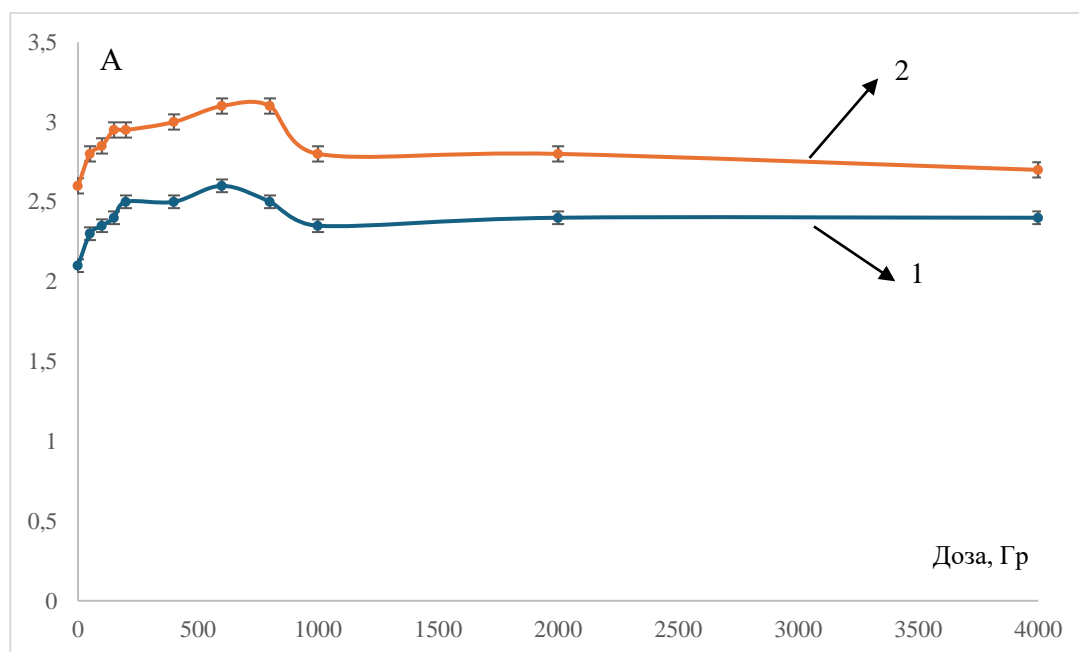


Рисунок 5.1.3– Оптическая плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* штаммом Т 985 без добавки AgNO_3 в анаэробных условиях в зависимости от дозы :1– 3 часа после облучения, 2– 24 часа после облучения

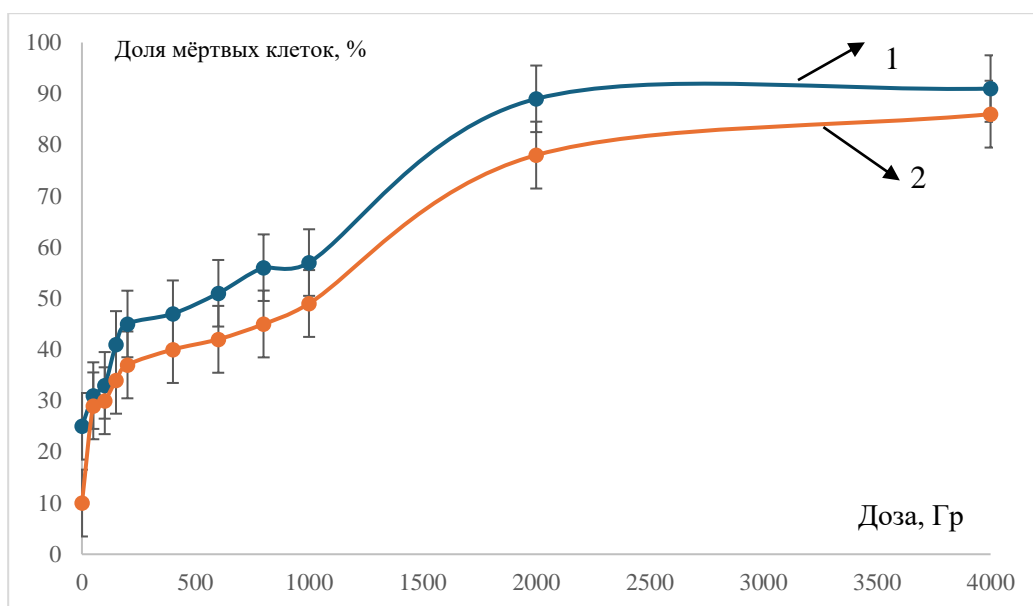


Рисунок 5.1.4 – Зависимость доли мертвых клеток в суспензии дрожжей без добавки AgNO_3 в анаэробных условиях, 1– 3 часа облучение, 2– 24 часа облучение

В отсутствие кислорода образование активных форм кислорода (АФК) минимально, что снижает окислительный стресс и повышает устойчивость клеток к радиации. Это подтверждается тем, что в анаэробных условиях для достижения той же степени повреждения требуется более высокая доза облучения. В анаэробии отсутствует окислительный стресс, поэтому даже при дозах 50–200 Гр снижение оптической плотности через 3 часа менее выражено, чем в аэробных условиях. В отсутствие АФК клетки быстрее репарируют повреждения ДНК. При 2000 Гр оптическая плотность через сутки достигает 1,5 (в аэробных условиях — 2,1), что указывает на замедленное, но стабильное восстановление [216].

На рис. 5.1.2. и 5.1.4. показано, что рост дозы облучения (от 0 до 4000 Гр) приводит к увеличению доли мёртвых клеток как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Максимальная гибель клеток (80–100%) наблюдается при 4000 Гр. В аэробных условиях радиационное воздействие более эффективно: при 4000 Гр и 24-часовом облучении гибнет 100% клеток. Это связано с кислородным эффектом, который усиливает образование свободных радикалов и, соответственно,

повреждение клеточных структур. В анаэробных условиях выживаемость клеток выше: при тех же дозах и времени облучения гибель не превышает 80%. Отсутствие кислорода снижает уровень радиационных повреждений, что подтверждает важную роль окислительного стресса в разрушении клеток. Увеличение времени облучения с 3 до 24 часов значительно повышает гибель клеток, особенно в аэробных условиях. Например, при 4000 Гр доля мёртвых клеток возрастает с 80% (через 3 часа) до 100% (через 24 часа). Таким образом, для достижения максимальной гибели дрожжевых клеток наиболее эффективно сочетание высоких доз облучения (≥ 3000 Гр), аэробных условий и длительного времени воздействия.

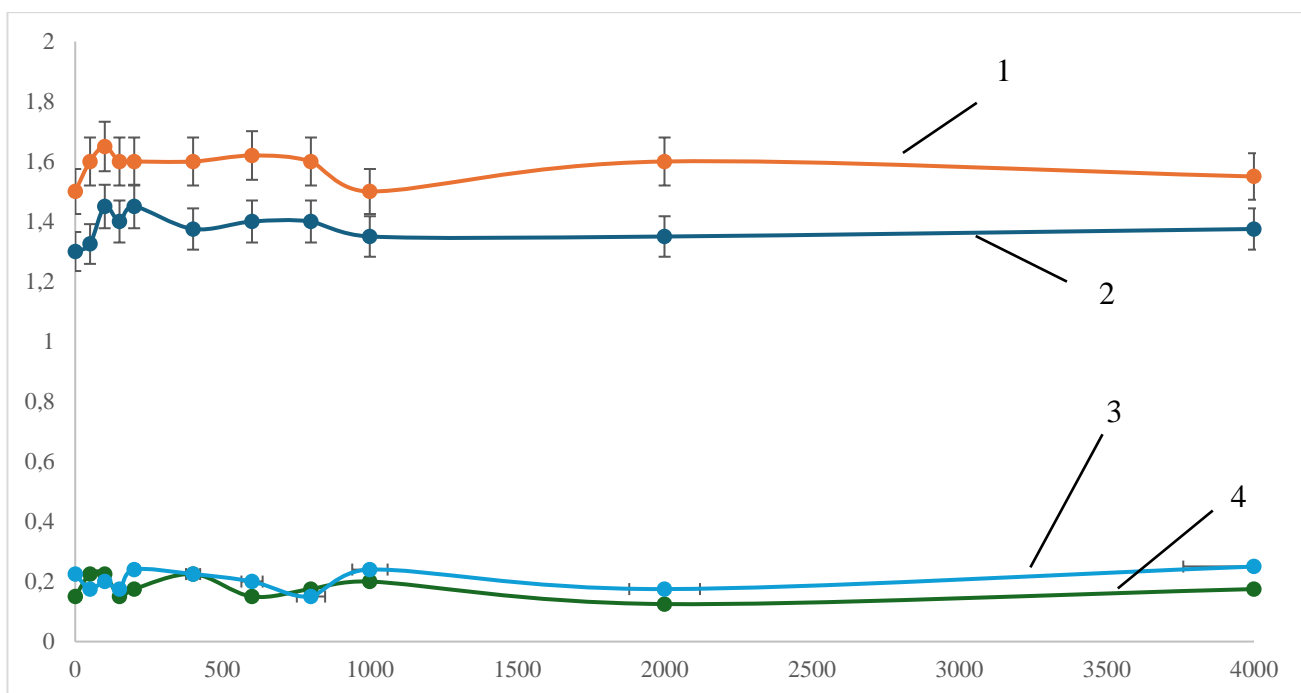


Рисунок 5.1.5. Оптический плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* в аэробных условиях с внесением AgNO_3 (10^{-2} и 10^{-3} М) в зависимости от дозы: 1– с AgNO_3 10^{-3} М (пост-эффект), 2– с AgNO_3 10^{-3} М (3 часа), 3– с AgNO_3 10^{-2} М(пост-эффект), 4– с AgNO_3 10^{-2} М (3 часа)

На рис. 5.1.5 представлена оптическая плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* в аэробных условиях при добавлении AgNO_3 в концентрациях 10^{-3} М и 10^{-2} М, в зависимости от дозы воздействия.

Как видно из рисунка 5.1.5, (кривая 1) оптическая плотность суспензии остаётся практически стабильной, свидетельствуя о минимальном влиянии дозы воздействия на рост дрожжей.

Кривая 2 показывает, что оптическая плотность суспензии также остаётся относительно стабильной, однако ниже, чем в условиях пост-эффекта.

Кривая 3 показывает, что оптическая плотность суспензии существенно ниже, что доказывает токсическое действие высокой концентрации нитрата серебра.

Кривая 4 показывает, что наблюдается самая низкая оптическая плотность суспензии наблюдается при повышенной концентрации нитрата серебра в течение указанного времени.

Таким образом, можно сделать вывод что концентрация нитрата серебра 10^{-3} М оказывает минимальное воздействие на дрожжи, особенно при пост-эффекте. Повышение концентрации до 10^{-2} М значительно снижает оптическую плотность, указывая на токсичность для дрожжей. Токсичность нитрата серебра усиливается при увеличении концентрации и времени воздействия.

Наночастицы серебра, полученные из AgNO_3 , совместно с рентгеновским излучением, усиливают повреждение клеток дрожжей, особенно в аэробных условиях. Более высокие концентрации AgNO_3 (10^{-2} М) приводят к катастрофической гибели клеток, в то время как анаэробная среда частично смягчает воздействие радиации. Это исследование подчеркивает роль окислительного стресса и токсичности наночастиц в модулировании реакции на облучение, что имеет значение для антимикробной терапии и радиационной биологии.

Биогенные наночастицы серебра (AgNPs), полученные с использованием природных восстановителей, обладают значительными преимуществами с точки зрения экологической безопасности по сравнению с синтетическими аналогами, что делает их перспективными для применения в промышленности в рамках концепции «зеленой» химии. Интеграция таких наночастиц в производственные процессы не

только снижает техногенную нагрузку на окружающую среду, но и повышает экономическую эффективность технологий. Важным свойством биогенных AgNPs является их природная антиоксидантная активность, обусловленная биомолекулами, стабилизирующими поверхность наночастиц. В медицинских применениях это позволяет минимизировать лекарственную нагрузку на пациента за счет исключения необходимости назначения дополнительных антиоксидантных препаратов.

Таким образом, сочетание экологичности, биосовместимости и функциональной многоцелевости биогенных AgNPs открывает новые возможности для создания устойчивых и экономически выгодных решений в медицине, фармацевтике и промышленности.

5.1.2 Влияние наночастиц серебра на выживаемость клеток *S. cerevisiae* после облучения в присутствии растительных экстрактов

Для определения влияния внесения растительных экстрактов на выживаемость дрожжей использовались методы микроскопии и фотоколориметрии.

В начале были проведены тесты с использованием экстракта донника, экстракта багульника болотного и контроль, в который не добавлялись экстракты, а использовалась только суспензия дрожжей. Также в данные растворы не добавлялся раствор серебра. Растворы подвергли различным дозам облучений (400 Гр и 800 Гр) (Рис 5.1.6). Для определения уровня накопления биомассы по значениям оптической плотности использовался КФК-2.

Таблица 5.1.9 – Оптический плотность суспензии дрожжей *S. cerevisiae* с внесением различных экстрактов/ НЧ-Ag в зависимости от дозы

ОП	0 Гр	400 Гр	800 Гр
контроль	3,15	2,8	2,35
Э.б.б/ НЧ-Ag	2,05	2,1	1,95
Муррайя/ НЧ-Ag	2,2	2,3	1,95
Каркаде/ НЧ-Ag	1,95	1,9	2

Доля мертвых клеток *S. cerevisiae* с использованием данных растворов приведена на рисунке 5.1.6.

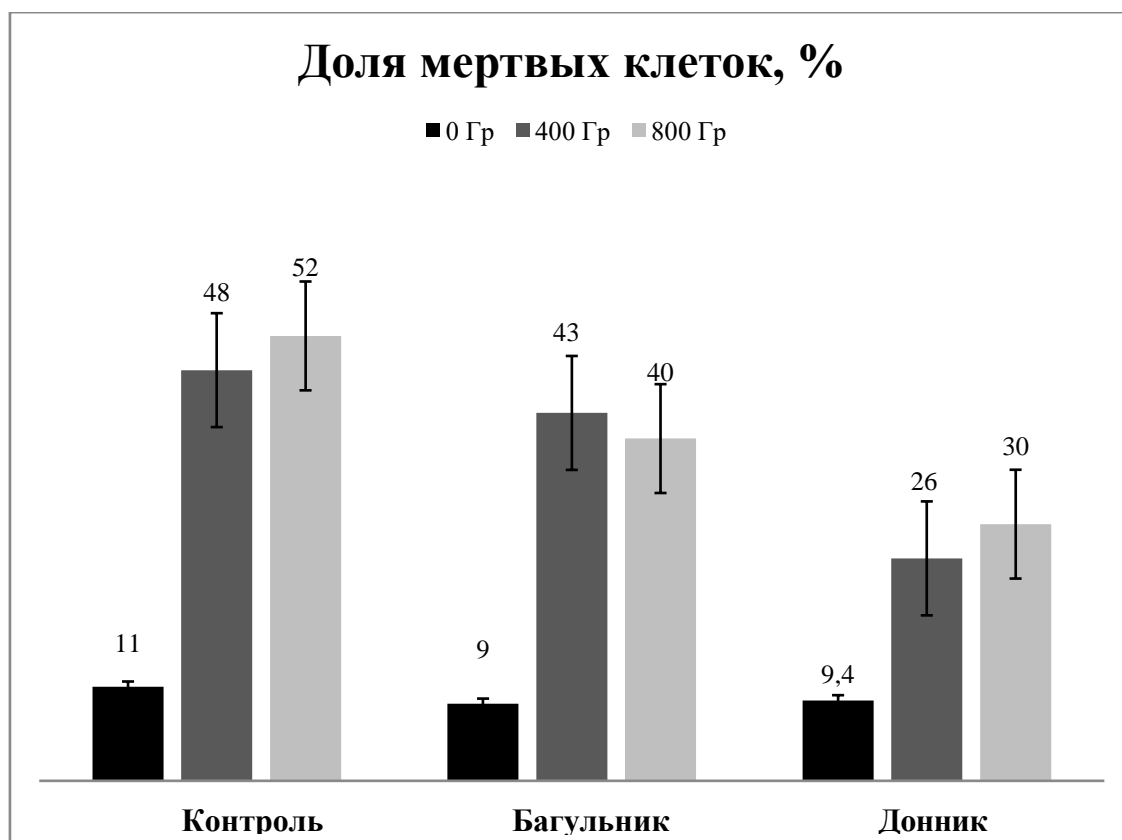


Рисунок 5.1.6 – Доля мертвых дрожжевых клеток *S. cerevisiae*

В проведенных экспериментах измеряли накопление биомассы дрожжей *S. cerevisiae* с добавлением экстрактов багульника болотного, донника лекарственного, которая увеличивается в сравнении с контролем. При этом

наблюдался прирост дрожжей относительно контроля как в варианте с облучением, так и без него. Такое повышение уровня накопления биомассы мы связываем с возможным проявлением антиоксидантной активности экстрактов, положительно влияющей на рост дрожжей независимо от того, подвергались или не подвергались клетки рентгеновскому облучению в использованных дозах. В присутствии ионов серебра, но без добавления экстрактов растений (контроль на рис. 5.1.7), уровень накопления биомассы дрожжей *S. cerevisiae* уменьшается после воздействия облучения при дозе 400 Гр и 800 Гр. Внесение экстрактов растений/ НЧ Ag привело к существенно меньшему накоплению биомассы по сравнению с контрольными образцами как до, так и после воздействия облучения.

Более явные различия при тех же вариантах условий экспериментов наблюдаются в изменении доли мертвых клеток (рис. 5.1.6 и 5.1.8). Присутствие растительных экстрактов (багульника и донника) в отсутствие серебра существенно снижает долю мертвых клеток как без рентгеновского облучения, так и в вариантах с облучением. При этом воздействие рентгеновского облучения и повышение дозы облучения резко увеличивают долю мертвых клеток. Добавление серебра в 2–3 раза увеличивает долю мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* и в отсутствие, и в присутствии экстрактов растений как до, так и после действия рентгеновского облучения.

Исходя из гистограммы (рисунки 5.1.6 и 5.1.8), можно сделать вывод, что экстракт донника обладает наиболее выраженными радиопротекторными свойствами. Однако при достижении значений поглощенной дозы в 800 Гр багульник болотный также начинает проявлять заметные радиопротекторные свойства.

Далее были проведены эксперименты по оценке выживаемости дрожжевых клеток после облучения с использованием экстрактов багульника болотного, муррайи метельчатой и каркаде с добавлением наночастиц серебра.

Измерение уровня накопления биомассы представлено на рисунке 5.1.7.

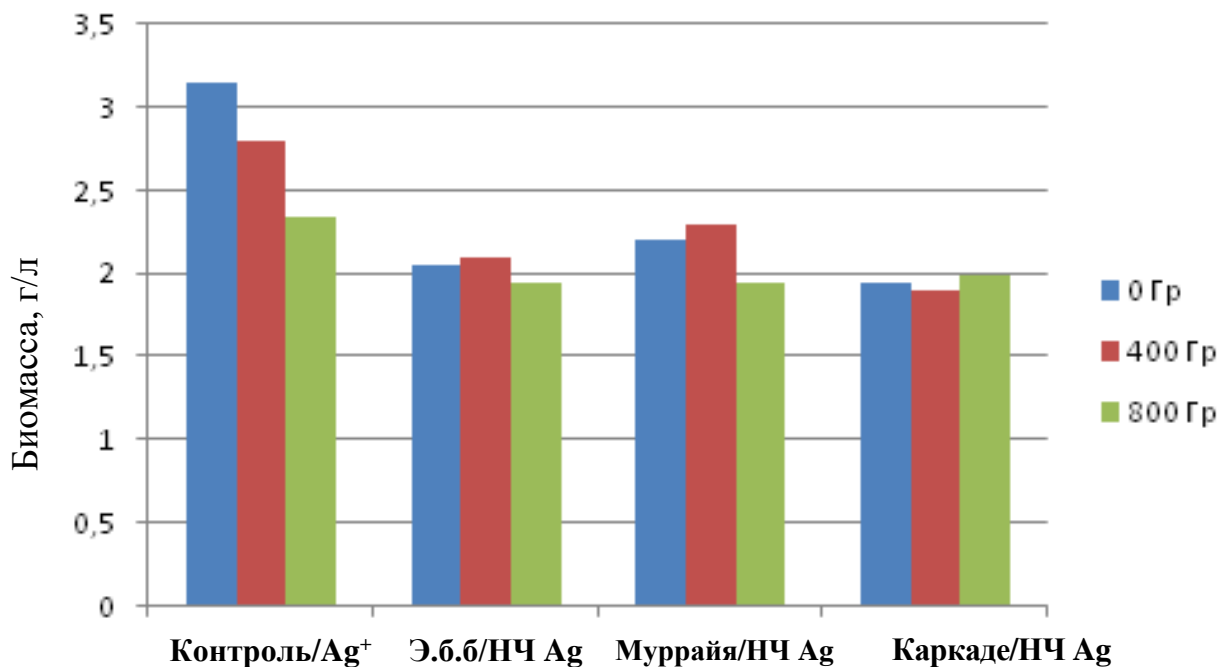


Рисунок 5.1.7 – Изменение уровня накопления биомассы *S. cerevisiae* в присутствии экстрактов растений/НЧ Ag в зависимости от дозы облучения

Доля мертвых клеток *S. cerevisiae* с использованием данных растворов приведена на рисунке 5.1.15.

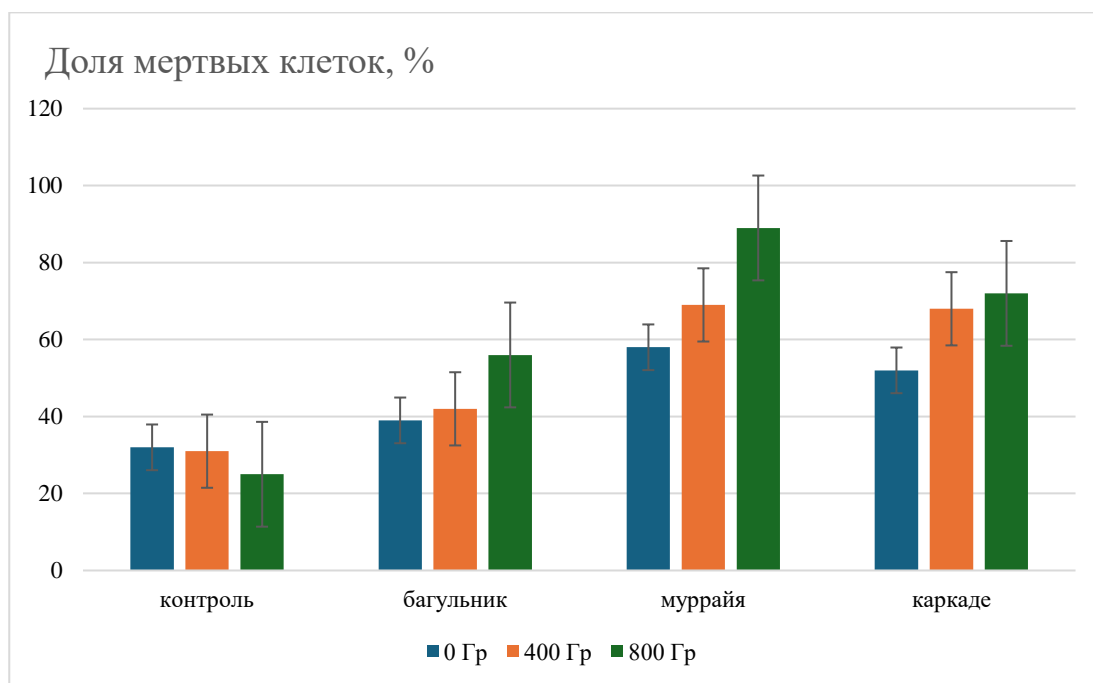


Рисунок 5.1.8 – Доля выживших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* в присутствии экстрактов растений/НЧ Ag в зависимости от дозы облучения

Таким образом, полученные результаты подтвердили возможное антиоксидантное и радиопротекторное действие экстрактов лекарственных растений. Кроме того показано, что присутствие ионов серебра оказывает токсическое действие на дрожжевые клетки во всех рассмотренных случаях.

На токсичные свойства серебра в отношении дрожжевых клеток в условиях проведения экспериментов может влиять как форма частиц серебра, так и их состояние: находятся ли они в растворенной, коллоидной формах или в виде наночастиц. Для выяснения возможного образования наночастиц серебра при добавлении использованных растительных экстрактов были построены кривые изменения оптической плотности при добавлении серебра в экстракты багульника болотного, муррайи метельчатой и каркаде. При этом особое внимание уделялось возможному воздействию видимого света на процесс образования наночастиц, как это было показано нами ранее для различных процессов микробиологического синтеза, в частности, в стрессовых условиях.

5.2 Влияние наночастиц селена на выживаемость клеток *S. cerevisiae* после облучения

Для оценки влияния наночастиц селена на выживаемость клеток *S. cerevisiae* до и после облучения при их внесении в дрожжевые суспензии с растительными экстрактами нами были проведены измерения динамики роста клеток дрожжей (оптической плотности суспензий) и доли мертвых клеток при аэрировании и в анаэробных условиях.

Результаты экспериментов приведены ниже на рисунках 5.2.1 и 5.2.2.

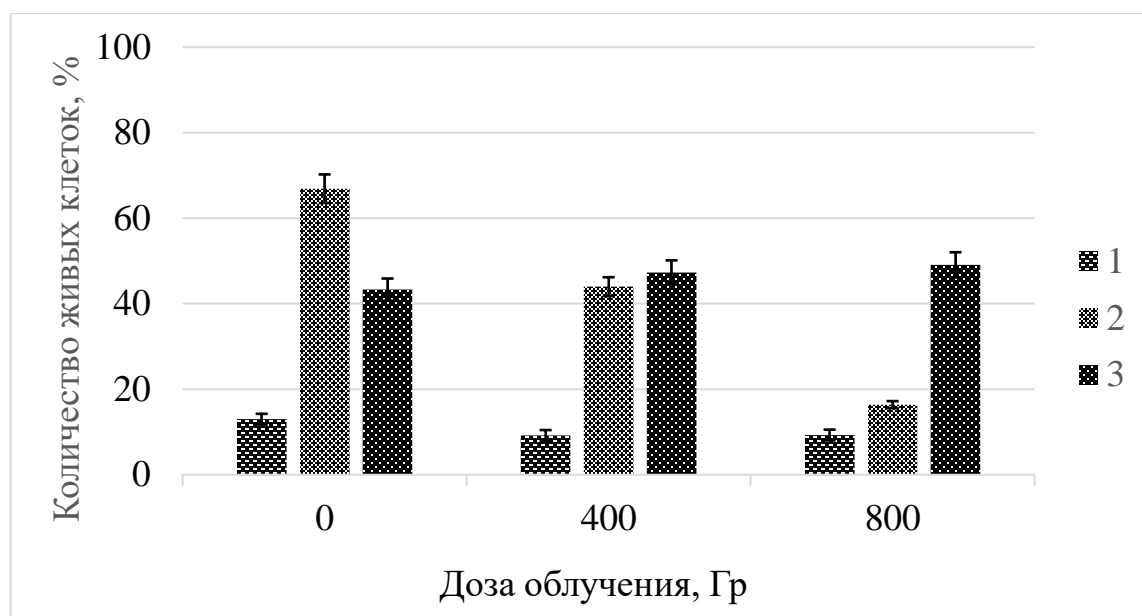


Рисунок 5.2.1 – Доля выживших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* через 3 часа после облучения

1 – Контроль (4 пассаж)

2 - э.б.б /H₂O/НЧ-Se, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 600 мкл водного экстракта бб 1:10 21.03.2023 и 7,4 мл водного раствора Na₂SeO₃ 100 мМ

3- э.б.б /H₂O/НЧ-Se, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 600 мкл водного экстракта бб 1:10 21.03.2023, 7,4 мл водного раствора Na₂SeO₃ 100 мМ и 45 мкл H₂O₂

Количество живых клеток в контрольном образце под воздействием солнечного воздействия составило 13%. В растворе багульника болотного с наночастицами селена выживаемость составила 67%, что в 5 раз больше. Что говорит о потенциальных радиопротекторных свойствах данного раствора и его способности защищать клетки от воздействия солнечного излучения. При воздействии рентгеновского излучения 400 Гр количество живых клеток уменьшается на 44%, а при 800 Гр на 75%. Также при действии рентгеновского

облучения количество живых клеток в образце с экстрактом багульника болотного с наночастицам селена заметно выше, чем в контрольном образце. Таким образом, использование раствора с экстрактом багульника болотного и наночастицами селена позволяет повысить радиопротекторные свойства.

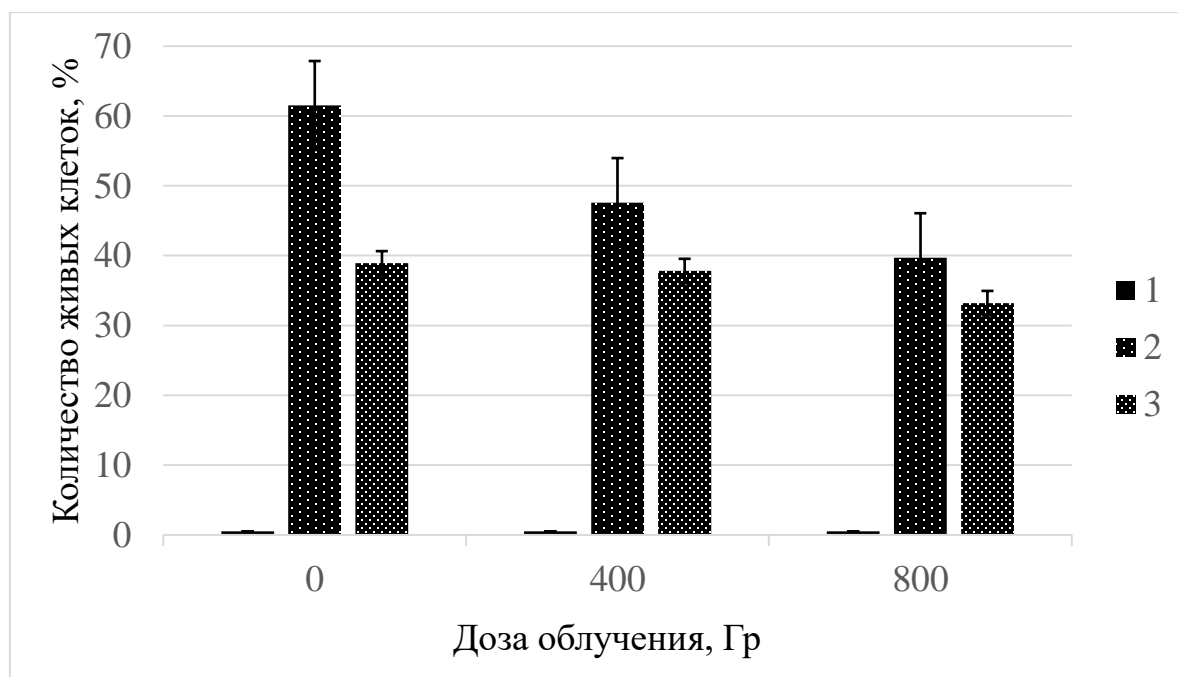


Рисунок 5.2.2 – Доля выживших дрожжевых клеток *S. cerevisiae* через 24 часа после облучения

1 – Контроль (4 пассаж)

2 - э.б.б /H₂O/НЧ-Se, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 600 мкл водного экстракта бб 1:10 и 7,4 мл водного раствора Na₂SeO₃ 100 мМ

3- э.б.б /H₂O/НЧ-Se, полученный под действием дневного рассеянного видимого света, при использовании 600 мкл водного экстракта бб 1:10, 7,4 мл водного раствора Na₂SeO₃ 100 мМ и 45 мкл H₂O₂

Через 24 часа после облучения живых клеток в контрольном образце практически отсутствовали живые клетки, что может быть обусловлено воздействием УФ-излучения. В образце с экстрактом багульника болотного и

наночастиц селена изменений не наблюдалось. Что говорит о способности раствора защищать клетки от воздействия солнечного излучения. Также при облучении 800 Гр через 24 ч наблюдается репарация дрожжевых клеток *S. cerevisiae*, доля живых клеток, по сравнению с образцом после облучения через 3 часа, увеличилась в 3 раза. Это указывает на эффективность репаративных механизмов клеток, которые активируются в ответ на воздействие рентгеновского излучения и способствуют восстановлению клеточной жизнеспособности. Таким образом, использование экстракта багульника болотного с наночастицами селена увеличивает количество живых клеток и позволяет им восстановиться после облучения, что указывает на потенциальное использование данного раствора, как радиопротекторного препарата.

5.2.1 Влияние пероксида водорода в присутствии наночастиц селена на выживаемость клеток дрожжей

Воздействие ионизирующего излучения на водные растворы приводит к образованию H_2O_2 , которую можно оценить методом йодометрии по стандартной методике. На рисунке 5.2.3 представлены зависимости накопления пероксида водорода в водных растворах с разным содержанием экстракта багульника болотного(э.б.б.)/НЧ-Se.

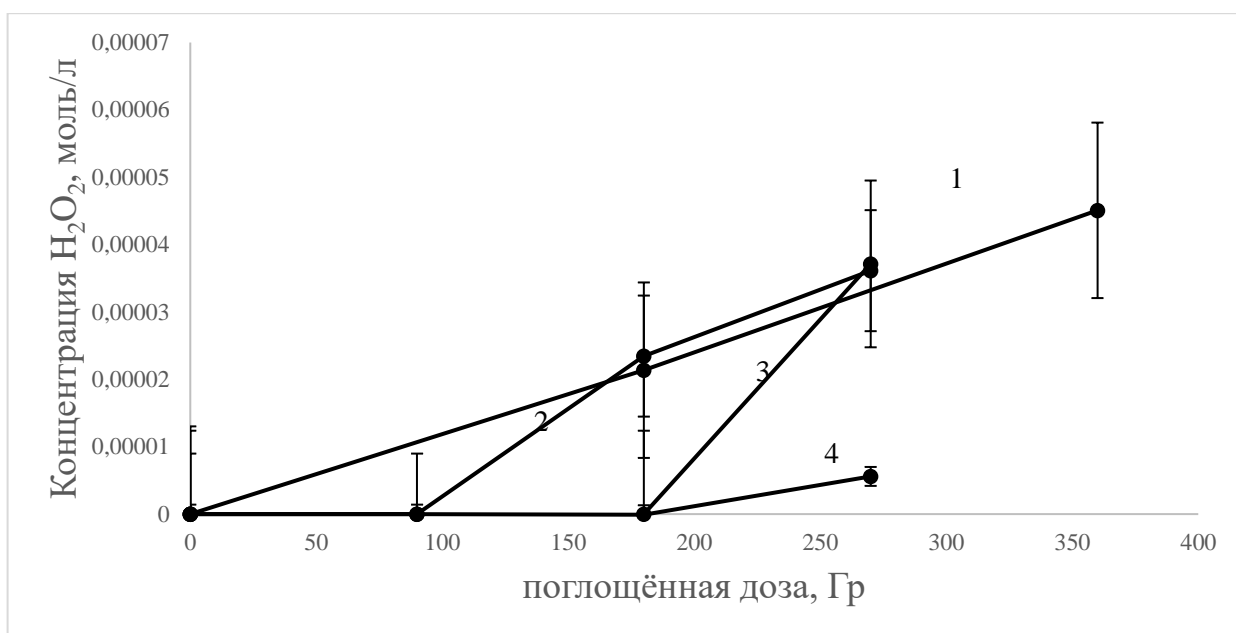


Рисунок 5.2.3 – Концентрация образования пероксида водорода в зависимости от дозы

1 – H₂O (образец №1- контроль)

2 – 0,5 мл э.б.б /НЧ-Se (образец №2)

3 – 1 мл э.б.б /НЧ-Se (образец №3)

4 – 1,5 мл э.б.б /НЧ-Se (образец №4)

Таблица 5.2.1 – Определение пероксида водорода

№ образца	Зона ингибирования пероксида водорода (индукционный период)	Участок расчёта рад. выхода	$G_{H_2O_2} \frac{\text{молекул}}{100 \text{ эВ}}$
1(контроль)	0	-	0,96
2 (0.5 мл НЧ-Se)	>60 Гр	60-180 Гр	1,93
3 (1 мл НЧ-Se)	>180 Гр	180-270 Гр	3,93
4 (1.5 мл НЧ-Se)	>180 Гр	180-270 Гр	0,60

Как мы видим, экстракт багульника болотного в присутствии наночастиц селена подавляют образование пероксида водорода. Также увеличение содержания

данного раствора приводит к более высоким антирадикальным свойствам, подавления пероксида водорода. Так при облучении до 180 Гр раствора 1,5 мл наночастицами селена приводит к тому, что пероксид водорода не образуется. Полученные данные подтверждают эффективность полученного раствора в качестве препарата, способного подавлять образование пероксида водорода – активных форм кислорода, с которыми связывают многие окислительные и повреждающие свойства для живых клеток, особенно при действии облучения за счет перехватывания гидроксильных радикалов, пероксидных радикалов, это и есть антирадикальные свойства полученных наночастиц селена с использованием экстракта багульника [220].

В таблице 5.2.2 представлено обобщенное сравнение доли мёртвых клеток в присутствии различных антиоксидантов.

Таблица 5.2.2 – Влияние различных добавок на долю мёртвых дрожжевых клеток *S. cerevisiae*, %

До за, Гр	Оценка доли мертвых дрожжевых клеток <i>S. cerevisiae</i> в присутствии различных добавок, % (данные микроскопии) через 3 часа после облучения										
	нафта лин	H ₂ O ₂ , 0,6 г/л	EtO H	H ₂ O ₂ + нафта лин	Рутин в 70% EtOH	Рутин в 40% EtOH	Ионол в 70% EtOH	Лаба зник	Дон ник	Багу льни к	э.б.б. /нч Se
0	14	20	30	20	14	12	16	6	9	9	10
400	25	36	32	22	8	22	18	10	26	43	15
800	28	46	54	24	12	20	17	14	30	40	18

В таблице 5.2.2 представлено сравнение доли мёртвых клеток дрожжей *S. cerevisiae* при использовании различных соединений как меры оценки их антиоксидантного и радиопротекторного действия. Экспериментально показано, что:

- без облучения минимальная доля мёртвых клеток наблюдается при использовании лабазника (6%), а максимальная — с этанолом (30%). Внесение антиоксидантов (рутин в 70% растворе этанола и 40% растворе этаноле, ионол) и экстрактов растений уменьшают долю мёртвых клеток по сравнению с контрольными условиями (H_2O_2 и C_{10}H_8) на 20%.

- при дозе 400 Гр доля мёртвых клеток увеличивается для всех составов, однако минимальные значения сохраняются для рутина (8% в 70% растворе этанола). Экстракт лабазника (10%) демонстрирует лучшую радиозащиту среди экстрактов растений. Внесение наночастиц селена практически в 3 раза повышает радиопротекторные свойства экстракта богульника.

- при дозе 800 Гр: увеличение доли мёртвых клеток продолжается. Рутин в 70% этаноле остаётся самым эффективным радиозащитным средством (12%). Лабазник (14%) и ионол (17%) также показывают хорошие защитные свойства. Рутин в 70% этаноле демонстрирует наибольшую радиопротекторную активность, особенно при высоких дозах облучения. Лабазник и ионол также эффективны, но их защитные свойства ниже.

Анализ таблицы 5.2.2 показывает, что эффективность антиоксидантной активности изученных экстрактов и их сочетаний (по мере ее убывания) располагается в следующем ряду:

При дозе облучения D=400 Гр:

Рутин (70% этанол) > Лабазник > э.б.б./нч Se > Ионол (70% этанол) > Рутин (40% этанол) > $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_8$ > C_{10}H_8 > донник > Этанол > H_2O_2 > багульник

При дозе облучения D=800 Гр:

Рутин (70% этанол) > Лабазник > Ионол (70% этанол) > Рутин (40% этанол) > $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_8$ > C_{10}H_8 > э.б.б./нч Se > донник > багульник > H_2O_2 > Этанол

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы показана корреляция между химической структурой соединений и их способностью защищать клетки от оксидативного стресса, вызванного радиацией, а также подтверждена возможность использования клеток дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы для оценки их эффективности, что открывает новые возможности для синтеза и поиска более эффективных антиоксидантов и радиопротекторов как в России, так и для Республики Союз Мьянма.

На основании проведенных исследований сделаны следующие **выводы**:

Выводы

1. Доказана перспективность использования дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы для выявления и оценки потенциальных антиоксидантов и радиопротекторов среди растительных экстрактов и индивидуальных соединений.

2. Радиопротекторная активность кумаринов донника лекарственного подтверждена снижением выхода ионов калия из облучённых клеток, тогда как у багульника болотного такая активность отсутствует, что доказывает структурную специфичность радиопротекторных соединений и обосновывает выбор донника как перспективного источника для разработки радиозащитных препаратов.

- Свежеприготовленные экстракты багульника болотного, донника лекарственного, муррайи метельчатой и каркаде проявляют выраженные антиоксидантные и радиопротекторные свойства, обеспечивая защиту от окислительного стресса, индуцированного ионизирующим излучением, тест-систем дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*. Присутствие наночастиц серебра, полученных методом «зеленого» синтеза, вызывает токсическое действие на дрожжевые клетки как до, так и после воздействия рентгеновского излучения.

3. Установлено, что видимое освещение облучаемого биологического материала существенно снижает повреждающее и стерилизующее действие

ионизирующего излучения в экспериментах с дрожжами, что необходимо учитывать, например, при применении ионизирующего излучения для стерилизации различных видов сельскохозяйственной и пищевой продукции.

4. Впервые показано, что адаптация дрожжей *S. cerevisiae* к пероксиду водорода (0,6 и 6 г/л) не только повышает их устойчивость к облучению, но и приводит к значительному увеличению содержания сырого протеина (до +20%) и нуклеиновых кислот в биомассе, что свидетельствует о метаболической перестройке, направленной на усиление синтеза защитных молекул. Это доказывает перспективность использования пероксида водорода как стрессового индуктора в биотехнологии для повышения содержания белков и нуклеиновых кислот в дрожжах.

5. Предложен новый способ повышения радиационной устойчивости дрожжей-сахаромицетов (*Saccharomyces cerevisiae*) к воздействию ионизирующего излучения, на который получено «ноу-хау». Способ заключается в предварительной обработке клеток дрожжей биологически активным веществом рутином (витамином Р) в определенной концентрации (0,05 мМ в 40 % и 70% растворе этанола) до и после облучения (0 Гр, 400 Гр, 800, 2000 Гр), что позволяет значительно снизить оксидативный стресс, индуцированный радиацией, и повысить выживаемость клеточной популяции.

6. Установлено, что этанол в исследуемых концентрациях не обладает радиозащитным эффектом и снижает устойчивость дрожжевых клеток к ионизирующему излучению, при этом пострадиационная динамика жизнеспособности не зависит от времени наблюдения (3 ч и 24 ч).

7. Показано, что добавление ионола в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-3}$ М – $5 \cdot 10^{-4}$ М обеспечивает сильную радиопротекторную активность и повышает выживаемость дрожжей в 2–3 раза как при воздействии ионизирующего излучения, так и при добавлении пероксида водорода.

8. Установлено, что рутин стабилизирует антирадикальную активность после

облучения (ингибирование ДФПГ — 67–86%), а доля мертвых клеток дрожжей составляет 8-12% в зависимости от дозы облучения. Оптимальная защита достигается при концентрации рутина 0,05 мМ в 70% растворе этанола, доказывая важность используемого растворителя и дозозависимый эффект.

9. Нафталин также проявляет радиозащитное действие в отношении дрожжей *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*, которое особенно выражено для *S. cerevisiae*. Защитное действие нафталина, возможно, обусловлено его антиоксидантным действием в условиях окислительного стресса, развивающегося в результате перекрестных реакций в ответе клеток дрожжей на действие рентгеновского излучения.

10. Впервые установлено, что совместное действие экстракта багульника с наночастицами селена приводит к росту антиоксидантных свойств, увеличивая количество живых клеток дрожжей после облучения, что указывает на возможность использования данного экстракта, как радиопротекторного препарата.

В результате проведенной работы разработана методика тестирования растительных экстрактов и соединений кумаринового ряда на предмет выявления антиоксидантной активности с использованием клеток дрожжей р. *Saccharomyces* в качестве тест-системы, а также показана корреляция между химической структурой соединений и их способностью защищать клетки от оксидативного стресса, вызванного радиацией, что открывает возможности для синтеза и поиска более эффективных антиоксидантов и радиопротекторов для Республики Союза Мьянма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takeda T. A new murine model accelerated senescence / T. Takeda, M. Hosokawa, S. Takeshita // *Mech Ageing Dev* 17(2), – 1981, – Vol. 17(2), – P. 183–194. DOI: 10.1016/0047-6374(81)90084-1.
2. Emerit I. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel at the Chemobyl reactor / I. Emerit, A. Levy, L. Cernjavski, R. Arutyunyan and etc. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, – 1994, – Vol. 120(9), – P. 558–561.
3. Pahadiya S. Alteration of lethal effects of gamma rays in Swiss albino mice by *Tinospora cordifolia* / S. Pahadiya, J. Sharma // *Phytother. Res.* – 2003, –Vol. 7, – P. 552–554.
4. Пхйьо Мьинт У. Реакционная способность донника, багульника, муррайи и некоторых кумаринов в их составе: дис. канд. хим. наук / Пхйьо Мьинт У // М. : РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2018. – 145 с.
5. Wang W. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng* / W. Wang, Y. Zhao, ER. Raybur, DL. Hill, H. Wang, R. Zhang // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2007, – Vol. 59. – P. 589–601.
6. Вторичные метаболиты растений. Классификация вторичных метаболитов. Изопреноиды и алкалоиды. [Электронный ресурс] — URL: <https://biocpm.ru/vtorichnye-metabolity-rasteniy-fenolnye-soedineniya-i-minornye-gruppy-> (дата обращения: 21.03.2023)
7. Александрова В.А. Создание макромолекулярных антиоксидантов для защиты генома от ионизирующей радиации / В.А. Александрова, Г.П. Снигирева // *Биоантиоксидант: тезисы докл. IX международной конференции.* – Москва, – 2015, – 8 с.
8. Грачёв Н.Н. Защита человека от опасных излучений / Н.Н. Грачёв // М.: издательство «БИНОМ» Лаборатория знаний, – 2005, – 317 с.

9. Башура А.В. Применение фитотерапии при злокачественных онкологических заболеваниях молочной железы у собак и кошек / А.В. Башура, Н.А. Кузнецов // Лекарственные растения: биоразнообразие, технологии, применение: сборник научных статей по материалам I Международной научно-практической конференции. – Гродно: ГГАУ, 2014, – 276 с.
10. Goel H. C. Podophyllum hexandrum modulates gamma radiation-induced immunosuppression in Balb/c mice: Implications in radioprotection / H. C. Goel, H. Prakash, A. Ali, M. Bala // Molecular and Cellular Biochemistry, – 2007, – Vol. 295, – P. 93–103.
11. Kai Wang. Antioxidant activity and inhibition effect on the growth of human colon carcinoma (HT-29) cells of esculetin from Cortex Fraxini / Kai Wang, Ye Zhang, S.I.N. Ekinwe, Xianghui Yi, Xianxian Liu, Hengshan Wang, Yingming Pan // Med. Chem. Res. – 2010, – 7 С. DOI 10/1007/s0044-010-9426-y.
12. Эмануэль Н.М. Общая закономерность изменения содержания свободных радикалов при злокачественном росте / Н.М. Эмануэль // АН СССР. Ин-т хим. физики. - Препринт. - Черноголовка: [б. и.], – 1974, – 5 с.
13. Пиотровский М. С. Участие НАДФН-оксидазы плазмалеммы в генерации супероксид-анион радикала в апопласте / М. С. Пиотровский // Автореф. диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Москва, – 2012, – 23 с.
14. Bentsath A. Vitamin P / A. Bentsath, S. Rusznyak, A. Szent-Gyrgy // Nature. – 327 p.
15. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин // Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», – 2006. – 556 с.
16. Сирота Т.В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы // Биомедицинская химия. – 2013, – т. 59, – Вып. 4, – С. 399–410.

17. Kuo S.M., Leavitt P.S., Lin C.P., Dietary flavanoids interact with trace metals and of metallothionein level human intestinal cells// *Biol Trace Elem Res*, – 1998, – С. 135–153. DOI:10.1007/BF02783967.
18. Костюк В. А., Потапович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Изд-во БГУ, – Минск, – 2004, – 174 с.
19. Alvi N.K., Rizvi R.Y., Hadi S.M. Interaction of quercetin with DNA // *Bioscience RePorts*, – 1986, – Vol. 6, – P. 861–868.
20. Harman D. Free radical theory of aging // *Mutation research*. – 1992, – Vol. 275, № 3-6, – P. 257–266.
21. Grisiola S., Rubio V., Feijoo B., Mendelson J. Inhibition of lactic dehydrogenase and of pyruvate kinase by low concentration// *Physiol. Chem. Phys.* – 1975, – Vol. 7, – P. 473–475.
22. Кособуцкий В.С. Электронная структура и свойства гидроксильных радикалов / В.С. Кособуцкий и В.Д. Майборода // *Химия высоких энергий*, – 1989, – Т. 23, – №1, – 15 с.
23. Своллоу А. Радиационная химия органических соединений. – М.: Издательство иностранной литературы, – 1963, – 404 с.
24. Мартинович Г.Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г.Г. Мартинович и С.Н. Чуренкевич, – М., – 2008, – 159 с.
25. Hawkins C. *Bioch.Bioth. Acta* / C. Hawkins and M. Davies, – 2001, – Vol. 1504, – P. 196-219.
26. Экспериментальные методы химии высоких энергий: Учебное пособие / Под общ. ред. М.Я. Мельникова, Изд-во МГУ: – Москва, – 2009. – 824 с.
27. Пикаев А.К. Современная радиационная химия / А.К. Пикаев, экспериментальная техника и методы, наука, – М.: – 1985, – 374 с.
28. Апрышко Г.Н. Потенциально лечебно-профилактические субстанции для применения в онкологии из отечественных природных объектов (по материалам банка данных по противоопухолевым веществам РОНЦ) / Г.Н.

- Апрышко // Российский биотерапевтический журнал, – 2011, – № 1. – Т. 10, – 5 с.
29. Теплый Д.Л. Об участии свободных радикалов и антиоксидантов в молекулярно – клеточных механизмах старения / Д.Л. Тёплый // Свободные радикалы, антиоксиданты и старение: материалы II Международной научной конф. (Астрахань, 2–3 ноября 2011 г.), Астраханский государственный университет, издательский дом “Астраханский университет”, – Астрахань, – 2011, – С. 5–10.
30. Клебанов Г.И. Антиоксидантная активность ингибиторов свободнорадикальных реакций, используемых в перевязочном материале для лечения ран / Г.И. Клебанов, О.Б. Любицкий, С.Е. Ильина, Е.О. Медушева, В.В. Рыльцев и В.Н. Филатов // Биомедицинская химия, – 2006, – Т. 52, – № 1, – С. 69–82.
31. Waterman P. G., Mole S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites/ Blackwell Scientific Publication. London, 1994. – 238 с.
32. Антропова И.Г. Радиационно-химические превращения кумаринов и радиопротекторная активность кумаринов / И.Г. Антропова, Д.В. Андриевская, А.А. Фенин, А.А. Ревина и Л.Н. Урсова // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Тез. докл. – Москва, – 2007, – Т. 4, – 382 с.
33. Антропова И.Г. Влияние ионов металлов на радиационно-химические превращения кумаринов в растворах / И.Г. Антропова, А.А. Фенин, Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов, А.А. Ревина и Э.А. Парфенов // Химия высоких энергий, – 2008, – Т. 42, – № 6, – С. 559–560.
34. Меньщикова Е.Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Труфакин В. А. Окислительный стресс / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин // Патологические состояния и заболевания. Изд-во “Арта”, – Новосибирск, – 2008. – С. 174–179.

35. Ободовский И.М. Основы радиационной и химической безопасности: Учебное пособие/ И.М. Ободовский // Долгопрудный: Издательский дом “Интеллект”, – 2013, – 304 с.
36. Антропова И.Г. Радиационно-химические превращения кумаринов в органических растворителях / И.Г. Антропова, А.А. Фенин, А.А. Ревина // Химия высоких энергий, – 2007, – Т. 41, – № 2, – С. 90–94.
37. Антропова И.Г. Радиационно-химические превращения кумарина и его производных в водно-органических растворах. Дисс. на соискание ученой степени к.х.н. М.: – 2010 г. – 145 с.
38. Майрановский С.Г. Полярография в органической химии / С.Г. Майрановский, Я.П. Страдынь и В.Д. Безуглый // Л., – 1975. – 351с.
39. Thornalley P.J. The spin trapping of superoxide radicals / P.J. Thornalley and J.V. Bannister // Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. – Boca Raton: CRC Press, – 1986, – P. 133-136.
40. Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell and Gutteridge J. M. C. // 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, – 1999, – 543 p.
41. Антропова И.Г. Спектрофотометрические исследования радиационно-химических превращений кумаринов в обратно-мицеллярных системах / И.Г. Антропова, А.А. Ревина, Чжо Зин Хтут. // Успехи химической физики: Сб. тезисов докладов на Всероссийской молодёжной конференции, ИПХФ РАН. – Черногловка, – 2011, – 204 с.
42. Ревина А.А. Спектрофотометрические и хроматографические исследования продуктов радиационного окисления водных растворов 3,5-дигидрокситолуола / А.А. Ревина, О.Г. Ларионов, М.В. Кочетова, Г.М. Зимица, Г.И. Золотаревский и Г.И. Эль-Регистан // Химия высоких энергий, – 2004, – Т. 38, – № 3, – С. 176–182.
43. Меледина, Т. В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм : учебное пособие / Т. В. Меледина, С. Г. Давыденко. —

- Санкт-Петербург : НИУ ИТМО, 2015. — 88 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/91493> (дата обращения: 07.04.2026). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
44. Короткова Е.И. Вольтамперометрический метод определения суммарной активности антиоксидантов в объектах искусственного и природного происхождения. Автореф. дисс. на соискание учёной степени доктора химических наук. – Томск, – 2009, – 44 .
45. Безуглов В.В. Синтез новых производных кумарин-3-карбоновой кислоты как химических детекторов образования гидроксильных радикалов в биологических системах / В.В. Безуглов, Дж.Э. Бияглоу, Е.М. Маневич // Биоорганическая химия, – 1991, – Т. 23, – № 4, – С. 310–313.
46. Лушак, В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма (обзор) / В. И. Лушак // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995-1017. – EDN IBPPSR.
47. Аврамчик О.А. Закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов и их применение в аналитической практике. Автореф. дисс. к.х.н. – Томск, – 2006, – 21 с.
48. Кочетова М.В. Определение биологически активных соединений фенольной и полифенольной природы в различных объектах методами хроматографии / М.В. Кочетова, Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов, А.А. Ревина // Успехи химии, – 2007, – Вып. 1, – Т. 76, – С. 88–101.
49. Кузьмин М.Г. Методы исследования быстрых реакций, пер. с англ., М.: – 1977.
50. Land E.J. Trans. Far. Soc., – 1967, – Vol. 63, –1181 p.
51. Dorfman L.M. Journal of Chem. Phys. / L.M. Dorfman, I.A. Taub and R.E. Buhler, – 1962, – Vol. 36, – 3051 p.
52. Поздняков И.П. Оптические спектры и кинетические характеристики радикалов, возникающих при фотолизе водных растворов комплекса

- $\text{FeOH}_{\text{aq}}^{2+}$ и фенола / И.П. Поздняков, Ю.А. Соседова, В.Ф. Плюснин и др. // Известия Академии наук. Серия химическая, – 2004, – № 12, –1540 с.
53. Patel Rajesh M. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods / M. Patel Rajesh and J. Patel Natvar // Journal of Advanced Pharmacy Education and Research, – 2011, – Vol. 1, – P. 52-68.
54. Пикаев А.К. Современная радиационная химия / А.К. Пикаев, В.В. Громов и Г.Ф. // Егоров Радиолит газы и жидкостей. М.: Наука – 1986, – 440 с.
55. Бяков В.М. Внутритрековые химические процессы / В.М. Бяков и Ф.Г. Ничипоров // М.: Энерггоатомиздат. – 1985, – 152 с.
56. Харт Э. Гидратированный электрон / Э. Харт, М. Анбар // М.: Атомиздат – 1973, – 243 с.
57. Афанасьев А.М. Косвенная ионизация веществ / А.М. Афанасьев, Е.П. Калязин // М.: Знание – 1989, – 30 с.
58. Дертингер Г. Молекулярная радиобиология / Г. Дертингер и Х. Юнг // М.: Атомиздат. – 1973, – 30 с.
59. Амирагова М.И. Первичные радиобиологические процессы 2-е изд. (Под ред. Н.В. Тимофеева-Ресовского) / И.М. Амирагова // М.: Атомиздат – 1973, – 169 с.
60. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Ю.Б. Кудряшов // М.: Физматлит. – 2004, – 422 с.
61. Бак З. Основы радиобиологии / З. Бак и П. Александер // пер. с англ., М.: Атомиздат. – 1963, – 500 с.
62. Храменкова О.М. Основы радиобиологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей высших учебных заведений. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», – 2003, – 238 с.
63. Порошок рутина выдержки Джапоника софоры/выдержка рутина/порошок Витмайн п рутина для пищевой добавки [Электронный ресурс] — URL:

- https://russian.plants-extracts.com/quality-11428299-sophora-japonica-extract-rutin-powder-rutin-extract-rutin-vitmain-p-powder-for-dietarysupplement?utm_source=chatgpt.com(дата обращения 04,04,2024)
64. [Электронный ресурс] – Режим доступа. – Источник: https://shop.evalar.ru/encyclopedia/item/rutin-vitamin-r/?utm_source=chatgpt.com (дата обращения 25,02,2024)
65. Prochazkova D. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids / D. Prochazkova, I. Bousova, N. Wilhelmova // *Fitoterapia*. – 2011, – Vol. 82, – P. 513–523.
66. Тараховский Ю.В. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина: учеб. пособие // Ю.В. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов и Э.Н. Музафаров. – Пушино, – 2013, – 310 с.
67. Азарова О.В. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия / О.В. Азарова и Л.П. Галактионова // *Растительная химия, сырье*. – 2012, – №4, – С. 61–78.
68. Bubols G.B. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids / G.B. Bubols, V.D. Da Rocha, A. Medina-Remón, et al. // *Mini-Rev Med Chem. Res.* – 2003, – Vol.17, – P. 318–334.
69. Croft K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids / K.D. Croft // *Ann NY Acad Sci.* – 1998, – Vol.854, – P. 435–442.
70. Heim K.E. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships / K.E. Heim, A.R. Tagliaferro and D.J. Bobilya. // *Nutr Biochem.* – 2002, – Vol. 13, – P. 572–584.
71. Taubert D. Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants / D. Taubert, T. Breitenbach, A. Lazar, P. Censarek, S. Harlfinger and R. Berkels // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003, – Vol.35, – P.1599–1607.

72. Rice Evans C.A. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids / C.A. Rice Evans and N. J Miller. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996, – Vol. 20, – P.933–956.
73. Холмогоров В.Е. Фотохимические превращения 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола (ионола) / В.Е. Холмогоров, М.А. Иванов и Л.Н. Баранова // *Вестник СПбГУ.* – 2004, – Сер. 4, – вып. 1, – С. 119–122.
74. Brede O. Kinetics of formation and decay of 4-methyl-2,6-di-t-butylphenoxy radicals in cyclohexane solution / O. Brede and L. Wojnarovits. // *Radiat. phys. chem.*, – 1991, – Vol. 37, – №. 3, – P. 537-548.
75. Ganapathi M.R. Free electron transfer from several phenols to radical cations of non-polar solvents / M.R. Ganapathi, R. Hermann, S. Naumov, O. Brede // *Phys. chem. chem. phys.*, – 2000, – Vol. 2, – P. 4947–4955. DOI: 10.1039/b005864
76. Byakov V.M. Kinetics of Radiation-Chemical Reactions in a Nonuniform Colloid Particle / V.M. Byakov, L.T. Bugaenko, E.A. Antonova, D.V. Paramonov and V.I. Trofimov // *High Energy Chemistry*, – 2000, – Vol. 34, – № 6, – P. 356–360.
77. Paramonov D.V. Radiolysis of 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (ionol) in a lipid membrane in the presence of oxygen / D.V. Paramonov et al. // *Mendeleev communications*, – 1998, – Т. 8, – № 1, – С. 32–34.
78. Paramonov D.V. Radiation-Chemical Oxidation of Molecules in the Lipid Bilayer of Lecithin Liposomes by Radiolytic Products Formed in the Radiolysis of an Aqueous Dispersion / D.V. Paramonov, V.I. Trofimov // *High Energy Chemistry*. – 2003, – Vol. 37, – № 2, – P. 78-82.
79. Paramonov D.V. Radical Processes in the Low-Temperature Radiolysis of Liposome Dispersions / D.V. Paramonov, V.I. Trofimov, A.A. Knyazev // *High Energy Chemistry*. – 2004, – Vol. 38, – № 2, – P. 86–92.
80. Saraeva V.V. Influence of 2, 6-di-tert-butyl-methylphenol on the yields of alkane radiolysis products / V.V. Saraeva // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 1987, – Т. 42, – С. 1576–1577.

81. Antonova E.A. Effect of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol on the yield of alkane radiolysis products / E.A. Antonova, T.F. Troshchilova, V.V. Saraeva // Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 2. Khimiya. – 1987, – Т. 28, – № 1, – С. 66–70.
82. Меньщикова Е.Б. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.В. Кандалинцева // LAP LAMBERT Academic Publishing. –2012, – 496 С.
83. Эммануэль Н.М. Химическая и биологическая кинетика. – М.: Наука, – 2006.
84. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг / А.А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 2001, – №7, – с. 21–28.
85. Аскерова У.Ф. Активные формы кислорода в живых системах / У.Ф. Аскерова, Ф.Б. Аскеров // II Международная научная конференция, посвященная 80-летию академика РАЕН. – Астрахань, – 2011, – 41 с.
86. Долин П.И. Радиационная очистка сточных вод / П.И. Долин, В.Н. Шубин, С.А. Брусенцева // изд-во «Наука». – 1973, – 152 с.
87. Брусенцева С.А. Химия высоких энергий, / С.А. Брусенцева, А.Г. Прибуш, В.Н. Шубин, П.И. Долин // научные журналы. – 1971, – Т. 5, – 83 с.
88. Кучера Я. Проблемы физхимии / Я. Кучера, Е.В. Барелко, Л.И. Карташова, М.А. Проскурнин // – 1960, – Т. 2, – 183 с.
89. Touhill C.I. Water Pollut. Controll. Federat. / C.I. Touhill, E.C. Martin, M.P. Fujihara, D.E. Olesen, J.E. Stein, G. McDonnell J. // – 1969, – № 2, – Р. 44–60.
90. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю.Е. Колупаев // Вестник харьковского национального аграрного университета. Серия биология. – 2007, – вып. 3 (12), – С. 6–26.
91. Аллен А.О. Радиационная химия воды и водных растворов / А.О. Аллен // М.: Госатомиздат. – 1963, – 204 с.

92. Sousa-Lopes A. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress / A. Sousa-Lopes, F. Antunes, L. Cyrne, H.S. Marinho // FEBS Letters. – 2004, – № 578, – С.152–156.
93. Новиков В.Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки, и их фармакологическая регуляция / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014, – Т. 12, – № 4, – С. 13–21.
94. cAMP и cGMP [электронный ресурс], режим доступа: <https://www.differencebetween.com/difference-between-camp-and-vscgmp/> (дата обращения 9,04,2019).
95. Ефремов А.А. Компонентный состав биологически активных веществ донника лекарственного (желтого) / А.А. Ефремов, И.Д. Зыкова, М.М. Целуковская // Химия растительного сырья. – 2012. – № 3. – С. 111–114.
96. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999, – №1, – С. 2–7.
97. Рогов А.Г. Взаимосвязь между окислительным стрессом, дисфункцией митохондрий, их фрагментацией и апоптозом в клетках дрожжей: диссертация кандидата биологических наук: 03.01.04 / А.Г. Рогов // Место защиты: Федер. исслед. центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. – Москва, – 2016, – 159 с.
98. Stadtman E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions / E.R. Stadtman // Biochem. – 1993, – 62, – Р. 797–821.
99. Патышагулыев А. Роль окислительного стресса в нарушении клеточных функций и развитии заболеваний / А. Патышагулыев //Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2025, – №. 1-3 (100), – С. 70–72.

100. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / В. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Oxford university press. – 2015, – 905 p.
101. Цейликман В.Э. Влияние окислительного стресса на организм человека / В.Э. Цейликман, А.А. Лукин // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022, – №. 3-1 (117), – С. 206–211.
102. Дадали В.А. Метаболический синдром: оксидативный стресс и антиоксидантная защита / В.А. Дадали, Л. Хаим // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов 3-й Международной конференции, посвященной 110-летию доктора биологических наук, профессора А.П. Бресткина. – СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. – 2022, – С. 260-270.
103. Колупаев Ю.Е. Антиоксидантная система растений: клеточная компартментация, защитные и сигнальные функции, механизмы регуляции (обзор) / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец, Л.Ф. Кабашникова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019, – Т. 55, – № 5, – С. 419-440.
104. Луцак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий обзор / В.И. Луцак // Биохимия. – 2001, – Т. 66, – Вып. 5, – С. 592–609.
105. Санчес-Гомес Ф. Дж. Детоксифицирующие ферменты на стыке воспаления, окислительного стресса и лекарственной гиперчувствительности: роль глутатионтрансферазы P1-1 и альдозоредуктазы / Ф. Дж. Санчес-Гомес [и др.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2016, – Т. 7, – 237 с.
106. Аринбасарова А.Ю. Дыхательная цепь грибов и дрожжей как мишень действия стресс-факторов / А.Ю. Аринбасарова, Е.Н. Бирюкова, А.Г. Меденцев // VII Пушчинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие». – 2021. – С. 121–123.

107. Нотова С.В. Роль микроэлементов в антиоксидантной системе защиты организма / С.В. Нотова, О.В. Маршинская, Т.В. Казакова // Животноводство и кормопроизводство. – 2023, – Т. 106, – №. 1, – С. 183–191.
108. Секова В.Ю. Основные физиолого-биохимические и молекулярные аспекты адаптации к стрессовым факторам у дрожжей *Yarrowia lipolytica* : автореферат дис. кандидата биологических наук : 1.5.4. / В.Ю Секова; [Место защиты: ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» ; Диссовет 24.1.233.01 (Д 002.247.01)]. – Москва, 2023. – 25 с.
109. Комочков М.М. Дозиметрия ионизирующих излучений: учебное пособие для студентов ВУЗа. М.: ФИЗМАТЛИТ, – 2006, – 44 с.
110. О.И. Коротовских. Влияние малых доз ионизирующего излучения на биологические объекты. Магистерская диссертация, – 2020, – 62 с.
111. Черниченко В.И. Интраоперационная лучевая терапия: технологическое обеспечение, возможности, перспективы / В.И. Черниченко // Вестник рентгенологии и радиологии. – 1996, – № 2, – С. 45–48.
112. Заяц Д.А. Анализ физиолого-биохимических свойств культур микроорганизмов, находившихся в условиях длительного воздействия ионизирующего излучения / Д.А. Заяц // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы XVII международной молодежной научно–практической конференции. – Пинск : ПолесГУ, – 2023. – Ч. 2. – С. 211-213.
113. Посев по Коху. [Электронный ресурс] — URL: <https://studfile.net/preview/6019592/page:25/> (дата обращения: 20.04.2022)
114. Ромодин Л.А. Биологические реакции при комбинированном действии ионизирующего излучения с иными факторами / Л.А. Ромодин, А.С. Умников, А.С. Самойлов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2025, – Т. 70, – №. 3, – С. 22–33.

115. Цыб Т.С. Ранние биологические эффекты действия ионизирующих излучений с различной ЛПЭ в малых дозах у клеток дрожжей / Т.С. Цыб, И.В. Малинова, Е.В. Комарова // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2006, – Т. 15, – №. 1-2, – С. 163-170.
116. Биотехнологии в сельском хозяйстве: учеб. пособие / авт.-сост. А. Н. Рожкова ; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых. – Владимир : Изд-во ВлГУ, – 2024. – 148 с. ISBN 978-5-9984-1952-2.
117. Васин М.В. Радиомодуляторы как средства биологической защиты от окислительного стресса при воздействии ионизирующей радиации / М.В. Васин, И.Б. Ушаков // Успехи современной биологии. – 2020, – Т.140, – №1, – С. 3-18.
118. Кишковская С.А. Природные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, перспективные для производства вин типа Херес / Кишковская С.А. [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020, – Т. 56, – №. 3, – С. 275–282.
119. Tippelt A. *Saccharomyces cerevisiae* as host for the recombinant production of polyketides and nonribosomal peptides / A. Tippelt, M. Nett // *Microbial Cell Factories*. – 2021, – Т. 20, – №. 1, – 161 с.
120. Имамов М.А. Влияние рентгеновского излучения на биологические свойства фага и на клетки бактерий рода *Pseudomonas Aeruginosa* / М.А. Имамов, Р.А. Шарафутдинов, М. Сидорова // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии / Материалы III-й межвузовской студенческой научной конференции. – Ульяновск: ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА», – 2010, – С. 53–54.
121. Абрамова А.А. Изменение в составе клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* при длительном периодическом стрессовом воздействии / А.А. Абрамова, С.А. Кочетков, С.В. Калёнов // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. XXXVIII Международной

- конференции молодых учёных по химии и химической технологии «МКХТ-2024» № 8 (287). – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2024, – С.133-136.
122. Булгаков А.М. Повышение питательной ценности полнорационной кормовой смеси для коров в период раздоя использованием кормовой добавки «Винасса» / Булгаков А.М. [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2025, – №. 5 (247), – С. 37–41.
123. Кожемякин Д.С. Получение кормовой добавки на основе биотехнологических процессов переработки пивной дробины / Д.С. Кожемякин, Е.П. Каменская // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2025, –7 с.
124. Ярован Н.И. Изучение антиоксидантного действия адаптогенных добавок для коров в стрессогенных условиях промышленного содержания / Н.И. Ярован, Н.А. Ивлева, В.М. Маркина // Биология в сельском хозяйстве. – 2025, – №1 (46), – С. 2–5.
125. Орлов Ю.П. Патологические аспекты кислорода, гипоксии и свободнорадикального окисления при критических состояниях / Ю.П. Орлов, С.В. Свиридов, Е.Н. Какуля // Клиническое питание и метаболизм. – 2021, – Т. 2, – №2, – С. 66–79. Doi: 10.17816/clinutr88951.
126. Ямашев Т.А. Влияние предварительной активации дрожжей пероксидом водорода на их адаптацию к кислотному стрессу / Т.А. Ямашев, О.А. Решетник // Вестник Казанского технологического университета. – 2010, – №. 11, – С. 301-306.
127. Цейликман В.Э. Влияние окислительного стресса на организм человека / В.Э. Цейликман, А.А. Лукин // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022, – №. 3–1 (117), – С. 206–211.
128. Ann C. Birge, Cornelius A. Tobias. Radiation sensitivity of yeast cells grown in aerobic and anaerobic environments / Ann C. Birge and Cornelius A. Tobias // Biology, Medicine Archives of biochemistry and biophysics. – 1954, – С. 422–428.

129. Белоус Д.А. Радиация, биосфера, технология. – СПб.: Изд-во ДЕАН, – 2004, – 448 с.
130. Галицин Э.А, Радиобиология: Курс лекций. Гродно: ГрГУ, – 2011. – 204 с.
131. Ярмоненко. Человека и животных, учеб. для биол. спец. ВУЗов, 3-изд., Высшая школа. – 1988г. – 424 с.
132. Влияние спирта на активность дрожжей [электронный ресурс], режим доступа: http://filimonov.vladimir.ru/samogon/stat/7_1.php (дата обращения 27.4.2020).
133. Smith et al. Journal of Yeast Biology и биохимических обзоров (Annual Review of Microbiology, 2022). – 2020, – 10 с.
134. Белицкий Г.А. Химический канцерогенез. – 1999, – 11 с.
135. Трифонова А.Р. Канцерогенное действие ароматических аминов / А.Р. Трифонова, М.А. Ханчевский // Экологическая безопасность в техносферном пространстве. – 2020, – С. 162–164.
136. Shahrestani M. Comparison between Different Extraction Methods for Determination of Primary Aromatic Amines in Food Simulant / M. Shahrestani, M.S. Tehrani, S. Shoeibi, P.A. Azar, S.W. Husain // Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2018, – P. 1–9.
137. Кричевский Г.Е. Экологичный «зелёный» биосинтез наночастиц металлов, реальность и потенциал их использования в различных областях медицины / Г.Е. Кричевский // Нанотехнологическое общество России. – 2017, – С. 147–148.
138. Gan P.P. Rev. Environ. / P.P. Gan and S.F. Li // Sci. Biotechnol. – 2012, –Vol. 11, – P. 169–206.
139. M. Sathishkumar, K. Sneha, Y.S. Yun. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using Curcuma longa tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity / M. Sathishkumar, K. Sneha, Y.S. Yun // Technol. – 2010, – Vol. 101, – № 20, – P. 7958–7965.

140. Mochizuki C. Effects of Au States in Thiol-Organosilica Nanoparticles on Enzyme-like Activity for X-ray Sensitizer Application: Focus on Reactive Oxygen Species / C. Mochizuki, J. Nakamura and M. Nakamura // ACS Omega. – 2023, – Vol. 8, – P. 9569–9582.
141. Aziz Mousavi S.M.A. Characterization of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Lactobacillus rhamnosus GG and its In Vitro Assessment Against Colorectal Cancer Cells / S.M.A. Aziz Mousavi, S.A. Mirhosseini, M.R. Sh Panahi // Hosseini Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2020, – Vol. 12(2), – P.740–746.
142. Mali S.C. Green synthesis of copper nanoparticles using Celastrus paniculatus Willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal properties / S.C. Mali, A. Dhaka, C.K. Githala and R. Trivedi // Biotechnology Reports. – 2020, – 9 с.
143. Vu T.T. Green Synthesis of Selenium Nanoparticles Using Cleistocalyx operculatus Leaf Extract and Their Acute Oral Toxicity Study / T.T. Vu, P.T.M. Nguyen, N.H. Pham, etc. // Compos. Sci. – 2022, – Vol.6(307), – 12 с. <https://doi.org/10.3390/jcs6100307..>
144. Расмагин С.И. Получение наночастиц серебра методом «зеленого» синтеза в присутствии редкоземельных ионов. / С.И. Расмагин, Л.А. Апресян, В.И. Крыштоб, В.И. Красовский // Физическое материаловедение: Прикладная физика. – 2018, – № 2, – С. 64–69.
145. Basem M. Abdallah. Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Lotus lalambensis Aqueous Leaf Extract and Their Anti-Candidal Activity against Oral Candidiasis / Basem M. Abdallah, Enas M. AliGreen // American Chemical Society Omega 2021. DOI:10.1021/acsomega.0c06009.
146. Егорова Е.М. Нанотехнологии: методология исследований действия наночастиц металлов на биологические объекты: учебное пособие для вузов / Е.М. Егорова, А.А. Кубатиев // Издательство Юрайт. – Москва: – 2023, – 188 с.

147. Kim D.Y. (Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities / D.Y. Kim, A. Kadam, S. Shinde et al // Journal Sci. Food Agric. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8749>
148. Abbas K.A. The recent advances in the nanotechnology and its applications in food processing: a review / K.A. Abbas, A.M. Saleh, A. Mohamed, N. MohdAzhan // Journal of Food, Agriculture & Environment. – 2009, – Vol.7 (3&4), – P 14–17.
149. Karaca F., Öner M.A. Scenarios of nanotechnology development and usage in Turkey / F. Karaca, MA. Öner // Technol Forecasting and Social Change. – 2015, – Vol. 91, – P. 327–340.
150. Olawoyin R. Nanotechnology: the future of fire safety / R. Olawoyin // Saf Sci. – 2018, – Vol. 110, – P. 214–221.
151. Mihindukulasuriya S.D.F. Nanotechnology development in food packaging: a review. / S.D.F. Mihindukulasuriya, L.-T. Lim // Trends in Food Science and Technology, – 2014, – Vol.40, – Iss. 2, – P.149–167.
152. Tekade R.K. Nanotechnology for the development of nanomedicine / R.K. Tekade, R. Maheshwari, N. Soni, et al // In: Nanotechnology-based approaches for targeting and delivery of drugs and genes. Elsevier. – 2017, – P. 3–61.
153. Yarlagadda T. Recent developments in the Field of nanotechnology for development of medical implants / T. Yarlagadda, S. Sharma, P.K.D.V. Yarlagadda, J. Sharma // Procedia Manuf., – 2019, – Vol.30, – P. 544–551.
154. Nasrollahzadeh M. Risks of nanotechnology to human life / M. Nasrollahzadeh, S.M. Sajadi // Interface science and technology, 1st edn. Elsevier Ltd., – 2019, – P. 323–336.
155. Nasrollahzadeh M. An introduction to nanotechnology / M. Nasrollahzadeh, S.M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi // Interface science and technology, 1st edn. Elsevier Ltd., – 2019, – P. 1–27.

156. Cioffi N. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties / N. Cioffi, L. Torsi, N. Ditaranto et al // Chem Mater. – 2015, – Vol.17, – P. 5255–5262.
157. Cabral M. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population / M. Cabral, C. Viegas, M. Teixeira, I. Sá-Correia // Chemosphere. – 2003, – Vol. 51, – P. 47–54.
158. Bekatorou A. Production of food grade yeasts / Bekatorou A, Psarianos C, Koutinas AA // Food Technol Biotechnol. – 2006, – Vol. 44, – P. 407–415.
159. Nasrollahi A. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi / A. Nasrollahi , R.H. Pourshamsian, P. Mansourkiaee // Int Nano Dimension. – 2011, – Vol.1(3), – P. 233–239.
160. Yang H.C. Toxicity of metal ions used in dental alloys: a study in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / H.C. Yang, L.A. Pon // Drug Chem Toxicol, – 2003, – Vol. 26, – P.75–85.
161. Sanseverino J. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds / J. Sanseverino, R.K. Gupta, A.C. Layton et al // Appl Environ Microbiol. – 2005, – Vol. 71, – P. 4455–4460.
162. Paladini F. Efficacy of silver treated catheters for haemodialysis in preventing bacterial adhesion / F. Paladini, M. Pollini, A. Talà et al // Journal of Material Science Mater Med. – 2101, – Vol. 23, – P. 1983–1990.
163. Zheng J. Study on the interaction between silver nanoparticles and nucleic acids in the presence of cetyltrimethylammonium bromide and its analytical application / J. Zheng, X. Wu, M. Wanget al // Talanta. – 2008, – Vol. 74, – P. 526–532.
164. Sondi I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria / I. Sondi, B. Salopek-Sondi // Journal of Colloid Interface Sci. – 2004, – Vol. 275, – P. 177–182.

165. Pal S. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli* / S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song // *Appl Environ Microbiol.* – 2007, – Vol. 73, – P. 1712–1720.
166. Wadhvani S.A. Green synthesis of selenium nanoparticles using *Acinetobacter* sp. SW30: optimization, characterization and its anticancer activity in breast cancer cells / S.A. Wadhvani, M. Gorain, P. Banerjee, U.U. Shedbalkar, R. Singh, G.C. Kundu, B.A. Chopade // *Int. journal of Nanomed.* – 2017, – Vol. 12, – P. 6841–6855.
167. Visha P. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles using *Lactobacillus acidophilus* bacteria by wet sterilization process / P. Visha , K. Nanjappan, P. Selvaraj, S. Jayachandran, A. Elango, G. Kumaresan G // *Int. J. Adv. Veterinary Sci. Technol.* – 2015, – Vol.4, – P. 178–183.
168. Sasidharan S. Comparison studies on the synthesis of selenium nanoparticles by various microorganisms / S. Sasidharan, R. Balakrishnaraja // *Int. J. Pure App Biosis.* – 2015, – Vol. 2, – P. 112–117.
169. Mohammadlou M. Hydrothermal green synthesis of silver nanoparticles using *Pelargonium*/*Geranium* leaf extract and evaluation of their antifungal activity / M. Mohammadlou, H. Jafarizadeh-Malmiri, H. Maghsoudi // *Green Process Synth.* – 2017, – Vol. 6(1), – P. 31–42.
170. Ghanbari S. Autoclave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using a *Fumigatus mycelia* extract and the evaluation of their physico-chemical properties and antibacterial activity / S. Ghanbari, H. Vaghari, Z. Sayyar, M. Adibpour, H. JafarizadehMalmiri // *Green Process Synth.* – 2018, – Vol. 7(3), – P. 217–224.
171. Skalickova S. Nanoparticles biosynthesized by yeast: a review of their application / S. Skalickova, M. Baron, J. Sochor // *Kvasny Prum.* – 2017, – Vol. 63(6), – P. 290– 292.
172. Faramarzi S. Selenium supplementation during fermentation with sugar beet molasses and *Saccharomyces cerevisiae* to increase bioethanol production / S.

- Faramarzi , Y. Anzabi , H. Jafarizadeh-Malmiri // Green Process Synth. – 2019, – Vol. 8(1), – P. 622–628.
173. Fardsadegh B. Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their in vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains / B. Fardsadegh, H. Jafarizadeh-Malmiri // Green Process Synth. – 2019, – Vol. 8(1), – P. 399–407.
174. Pérez-Corona M.T. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: laboratory-scale experiments / M.T. Pérez-Corona, M. Sánchez-Martínez, M.J. Valderrama, et al // Food Chem. – 2015, – Vol. 124(3), – P. 1050–1055.
175. Shaghaghi-Moghaddam R. Screening of the five different wild, traditional and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains to overproduce bioethanol in the batch submerged fermentation / R. Shaghaghi-Moghaddam, H. Jafarizadeh-Malmiri, P. Mehdikhani, S. Jalalian, R. Alijanianzadeh // Z Naturforsch C. – 2018, – Vol. 73 (9–10), – P. 361–366.
176. Shaghaghi-Moghaddam R. Optimization of submerged fermentation conditions to overproduce bioethanol using two industrial and traditional *Saccharomyces cerevisiae* strains / R. Shaghaghi-Moghaddam, H. Jafarizadeh-Malmiri, P. Mehdikhani, S. Jalalian, R. Alijanianzadeh // Green Process Synth. – 2019, – Vol. 8(1), – P. 157–162.
177. Hamza F. Selenium nanoparticle-enriched biomass of *Yarrowia lipolytica* enhances growth and survival of *Artemia salina* / F. Hamza, A. Vaidya, M. Apte, A.R. Kumar, S. Zinjarde // Enzyme Microb Technol. – 2017, – Vol. 106, – P. 48–54.
178. Коренская И.М. “Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины, хромоны” / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова // Изд-ско-полиграфический центр Воронежского гос. Университета. – 2007, – С. 57-205.

179. Лукашевич Н.П. Фитохимический анализ растений и сырья, содержащих простые фенольные соединения и кумарины / Н.П. Лукашевич, Г.Н. Бузук, Т.М. Шлома // Методическое пособие по фармакогнозии по разделу: “Растения и сырье, содержащие фенольные соединения”. – Иркутск, – 2009, – 116 с.
180. Куракина Е.С. Антирадикальная активность кумаринсодержащих экстрактов / Е.С. Куракина, И.Г. Антропова // Электронный сборник статей по материалам ХХІХ студенческой конференции «Научное сообщество студентов ХХІ столетия. Естественные науки». – Новосибирск: Изд-во “СибАК”. – 2015. – Т. 3(28), – С. 129–134.
181. Гринкевич Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич // Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебного пособия для студентов фармацевтических вузов в факультетах. – Москва, – 1983, – 90 с.
182. Patel Rajesh M. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods / M. Patel Rajesh and J. Patel Natvar // Journal of Advanced Pharmacy Education and Research. – 2011, – Vol. 1, – P. 52-68.
183. Патент RU2162599C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/14, № 99119871/13, заяв. 14.09.1999. Опубли. 27.01.2001. Способ идентификации и определения массовой концентрации ацетальдегида в спиртосодержащих растворах. Пальталлер Р.Р. Заявитель: Закрытое акционерное общества «Барнаульский ликеро-водочный завод».
184. Antropova I.G. Synthesis of colloidal solutions of silver nanoparticles by *Murraya paniculata* extracts and their antimicrobial activity / I.G. Antropova , Phyo Myint Oo, E.S. Kurakina, A.S. Smolyanskii, E.P. Magomedbekov// 5th International Conference on Catalysis and Chemical Engineering, San Francisco. – 202, – 2 С.

185. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин // Ленинградское отделение – 1986, – 432 с.
186. Шарифуллина Л.Р. Радиационно-химические превращения антиоксидантов фенольной природы и их комплексов с ионами металлов. Дисс. на соискание ученой степени к.х.н. – Москва, – 2004, – 169 с.
187. Соколовский А.Е. Хроматографические методы анализа: метод. указ. по разделу курса «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа» / А.Е. Соколовский, Н.А. Коваленко, Г.Н. Супиченко, Е.В. Радион // Изд-во Белорусск. ун-та. – 2002, – 118 с.
188. Андриевская Д.В. Совершенствование технологии столовых вин на основе регулирования их протекторных свойств. Диссертации на соискание ученой степени к.т.н. М.: ГУ ВНИИ ПБ и ВП. – 2009, –154 с.
189. Martin Berger. Medical imaging system / Martin Berger, Qiao Yang , Andreas Maier // X -ray imaging. – 2018, – p.119-145.
190. Александрова Э.А. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. / Э.А. Александрова, Н.Г. Гайдукова // Изд-во “Юрайт”. – М. 2016, – 355 с.
191. Антропова И.Г. Спектральное и хроматографическое исследование гамма-радиолиза кумаринов / И.Г. Антропова, Е.Н. Семенистая, А.А. Ревина // Сб. тезисов IV Баховской конференции по радиационной химии. – М., – 2005, – 12 с.
192. Warren Steck. Characterization of plant coumarins by combined gas chromatography, ultraviolet absorption spectroscopy, and nuclear magnetic resonance analysis / Warren Steck, B.K. Bailey // Canadian Journal of chem. – 1969, – Vol. 47, – P. 3577–3583.
193. Guillaume Lout. The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography /

- Guillaume Louit, Sarah Foley, Julie Cabilic, Herve Coffigny, Frederic Taran, Alain Valleix, Jean Philippe Renault, Serge Pin. // Radiation Physics and Chemistry – 2005, – Vol. 72, – P. 119-124.
194. Красовацкий Б.М. Органические люминофоры / Б.М. Красовацкий, Б.М. Болотин // Изд-во “Химия”, – М.: – 1984, – С.154-335
195. Григорьева О.А. Направленный поиск биологически активных веществ в ряду замещенных кумаринов / О.А. Григорьева, А.Ю. Никишин, О.В. Федотова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Поиск новых физиологически активных веществ: материалы IV-ой всероссийской с международным участием научно-методической конференции “Фармобразование 2010”. Часть II. “Научные основы создания новых лекарственных средств”. – Воронеж: Воронежский государственный университет, – 2010, – С. 128–130.
196. Шакир И.В. Общая биотехнология. Лабораторный практикум: учеб. Пособие / И.В. Шакир, А.А. Красноштанова, Е.В. Парфенова, Н.А. Суясов, Е.С. Бабусенко, В.Д. Смирнова. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, – 2008, – 120 С. ISBN 978-5-7237-0682-8.
197. Чернова О.Б. Теория лабораторного эксперимента / О.Б. Чернова, Г.П. Сигитова; Владим. гос. ун-т им. А. Г. и Н. Г. Столетовых // Техника безопасности в химической лаборатории. Лабораторная посуда и оборудование учеб. пособие – Владимир : Изд-во ВлГУ, – 2023, – 134 С. ISBN 978-5-9984- 1855-6.
198. Хромова Н.Ю. Биотехнологическая конверсия зернового сырья для получения пробиотических продуктов и кормовых белковых добавок : диссертация кандидата технических наук : 03.01.06 / Н.Ю. Хромова; [Место защиты: Рос. хим.-технол. ун-т им. Д.И. Менделеева]. – Москва, 2019, – 167 с.

199. Phyto Myint Oo. Influence of the reactive oxygen species and ionizing radiation on yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* under illumination by visible light / Phyto Myint Oo, V.I. Panfilov, A.E. Kuznetsov, I.G. Antropova, S.V. Kalenov // Journal of Agriculture and Environment. – 2023, – Vol. 1(29), – 8 с.
200. Borton Ludmila Nikolaevna. Radiation-chemical transformations of condensed aromatic hydrocarbons in aqueous solutions. Diss for the competition of scientists. degrees of candidate of chemical sciences. Kiev, – 1984. – 159 с.
201. Романова М.В. Молекулярно-биологическая и биохимическая характеристика внеклеточных протеаз термофильных бактериальных штаммов. / М.В. Романова, А.Е. Кузнецов, А.В. Белодед // Бутлеровские сообщения. – 2021, – Т.68, – №12, – С.103–111.
202. Maria V. Romanova. Molecular biological and biochemical characteristics of extracellular proteases of thermophilic bacterial strains / Maria V. Romanova, Alexander E. Kuznetsov, Andrey V. Beloded // Butlerov Communications. DOI: 10.37952/ROI-jbc-C/21-2-4-11
203. Иванищев В.В. Физиолого-биохимические характеристики побегов тритикале при NaCl-стрессе в свете статистических методов / Иванищев В.В. // Бутлеровские сообщения – 2021, – Т.68, – №12, – С.137–146.
204. Viktor V. Ivanishchev. Physiological and biochemical parameters of triticale shoots under NaCl-stress in the light of PCA method / Viktor V. Ivanishchev // Butlerov Communications. DOI: 10.37952/ROI-jbc-C/21-2-4-15
205. Беляева А.Д. Изучение влияния способа приготовления питательной среды на основе гороха на количество получаемой в процессе глубинного культивирования биомассы *Rhizopus oryzae*. / А.Д. Беляева, А.А Григорьева., И.Д. Беляева, Г.Г. Няникова // Бутлеровские сообщения. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/21-68-12-112

206. Лисаневич М.С. Влияние гамма-излучения на свойства литьевой марки полипропилена / М.С. Лисаневич, Р.Ю. Галимзянова // Бутлеровские сообщения. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/21-68-11-150
207. Maria Lisanevich S. Effect of radiation sterilization on air permeability and structure of HoloFiber® nonwoven fabric / Maria S. Lisanevich, Reseda Yu. Galimzyanova. // Butlerov Communications. DOI: 10.37952/ROI-jbc-C/21-2-4-3
208. Пхйё Мьинт У. Оценка выживаемости дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* в условиях освещения дрожжевых клеток видимым светом в присутствии пероксида водорода и нафталина в пост-радиационный период / Пхйё Мьинт У, В.И. Панфилов, А.Е. Кузнецов, И.Г. Антропова, С.В. Калёнов // Бутлеровские сообщения. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-73-1-116
209. Matt D. Wolfe. Hydrogen peroxide-coupled cis-diol formation catalyzed by naphthalene 1,2-dioxygenase / Matt D. Wolfe, John D. Lipscomb // Journal of Biochemistry. – 2003, – Vol. 278, – No.2, – P. 829-835.
210. Phy Myint Oo. The effect of reactive oxygen species and antioxidants on the survival of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* under the action of ionizing radiation. / Phy Myint Oo, V.I. Panfilov, A. E. Kuznetsov, I.G. Antropova and S.V. Kalenov. / RUSECOCON-2024. IOP Publishing (Scopus) https://doi.org/10.1007/978-3-031-64423-8_40
211. Ермолина Т.А. Аппаратное обеспечение методов лучевой терапии: учеб. Пособие/ /Т.А. Ермолина [и др.] // Сев. (Арктич.) федер. ун-т им. М.В. Ломоносова. - Архангельск: ИД САФУ, 2014. - 128 с.: ил. ISBN 978-5-261-00739-5
212. Usmanov SM (2001) Radiation: Reference materials. Moscow, Humanit. Ed. Center VLADOS, – 176 p.
213. Пхйё Мьинт У. Влияние антиоксидантов на выживаемости дрожжевых клеток при действия Рентгеновского облучения / Пхйё Мьинт У, В.И.

- Панфилов, С.В. Калёнов, И.Г. Антропова, М.О. Бочкова // *Chemical Bulletin*. – 2024, –Т. 7, – № 1, – С. 104–117.
214. Phyو Myint Oo. The influence of medicine plant extracts on viability of yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* under the action of ionizing radiation / Phyو Myint Oo, V.I. Panfilov, A.E. Kuznetsov, I.G. Antropova, S.V. Kalenov // RUSECOCON-2022. IOP Publishing 1061(2022)012051. DOI 10.1088/1755-1315/1061/1/012051
215. Пхйьо Мьинт У. «Зеленый» синтез наночастиц серебра с использованием экстрактов лекарственных растений и их влияние на выживаемость дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* T985 / Пхйьо Мьинт У, В.И. Панфилов, А.Е. Кузнецов, И.Г. Антропова, С.В. Калёнов // *Бутлеровские сообщения*. DOI: 10.37952/ROI-jbc-RC/23-6-3-5
216. Вишневецкая О.В. Нарушение репарации двунитевых разрывов ДНК у радиочувствительных мутантов дрожжей / О.В. Вишневецкая, А.Н. Лучник, Л.С. Арутюнова, С.В. Шестаков // *Saccharomyces cerevisiae*. Генетика. – 1983, – Т.19, – № 1, – С. 26–32.
217. Phyو Myint Oo. Estimation of radiation sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells strain T- 985 after exposure to stress factor of X-ray in the presence and absence of silver cations / Phyو Myint Oo, V.I. Panfilov, I.G. Antropova, S.V. Kalenov // RUSECOCON-2025. IOP – P.1-8. – DOI:10.1007/978-3-031-64423-8_40.
218. Кузнецов А.Е. Высокоэффективные экологически чистые совмещенные системы микробиологического синтеза и очистки сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием. Дисс. на соис, учен. степени д.т.н. // М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, – 2021, – 679 с.
219. Paramelle D. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra / Paramelle D., Sadovoy A., Gorelik S.,

- Free P., Hobley J., Fernig D. G. // Journal of analyt. – 2014, – Issu. 19, – P. 4855–4861.
220. Magomedov G.Yu. Application of aqueous extract of *ledum palustre* in “green” synthesis of selenium nanoparticles for assessment of radiation sensitivity of yeast cells / G.Yu. Magomedov, I.G. Antropova, S.V. Kalenov, Phyo Myint Oo // Rad journal. DOI: 10.21175/RADJ.2025.04.000.
221. Гончарова Т. А. Энциклопедия лекарственных растений. М.: Изд. дом "МСП", – 1997, – 559 С.
222. Донник. [Электронный ресурс] — [URL:http://www.c-cafe.ru/words/119/11780.php](http://www.c-cafe.ru/words/119/11780.php) (дата обращения 01.01.2025)
223. Гибискус. [Электронный ресурс] — [URL: https://eda-land.ru/travy/gibiskus/](https://eda-land.ru/travy/gibiskus/)
224. Proenca Barros FA, Rodrigues-Filho E. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: – 2012, 257–268
225. Лабазник. [Электронный ресурс] — URL: <https://www.neboleem.net/labaznik.php>
226. Басова Е.В. Химико-фармакологическое изучение багульника болотного. Дисс. к.т.н., ГОУВПО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск. – 2004, – 150 с.
227. Phyo Myint Oo. Influence of the reactive oxygen species and ionizing radiation on yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* under illumination by visible light / Phyo Myint Oo, V. I. Panfilov, A. E. Kuznetsov [et al.] // Journal of Agriculture and Environment. – 2023. – No 1(29). – P.1-8. – DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2023.1.39.006>.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Багульник болотный

Наибольший интерес для меня представляет багульник болотный как кумаринсодержащее лекарственное растение.

Багульник болотный (*Ledum palustre*) представляет особый интерес как кумаринсодержащее лекарственное растение с широким спектром биологической активности. Это вечнозелёный, сильно пахнущий кустарник высотой от 20 до 125 см. Молодые побеги покрыты густым рыжеватым опушением. Листья очерёдные, линейно-продолговатые, длиной 2–4 см и шириной 1,5–4 мм, с загнутыми краями, зимующие, сверху тёмно-зелёные и блестящие, снизу — опушённые, особенно вдоль центральной жилки. Цветки белые, пятичленные, длиной 4–8 мм, собраны в многоцветковые щитковидные соцветия на концах побегов. Цветёт в мае-июле, а семена созревают в июле–августе.



В медицинской практике используют листья и молодые побеги растения. Сбор сырья осуществляется в августе–сентябре, в период созревания плодов, путём заготовки облиственных однолетних побегов длиной до 10 см. Основные природные запасы багульника сосредоточены в Сибири. Все части растения, кроме корней, содержат эфирное масло, которое представляет наибольший фармакологический интерес благодаря высокому содержанию биологически активных компонентов. В состав растения входят дубильные вещества, кумарины, флавоноиды, фенолы, фенолкарбоновые кислоты, катехины, тритерпеноиды, а

также аскорбиновая кислота и широкий набор макро- и микроэлементов. Надземная часть содержит:

Макроэлементы(мг/г)- К-4,2, Са-6,1, Mg-2,0, Fe-0,45;

Микроэлементы(мкг/г)-Mn-0,54, Cu-0,05, Zn-0,06, Co-0,02, V-0,25, Cr-0,08, Al-0,37, Ba-0,98, Se-3,6, Ni-0,27, Sr-0,04, Pb-0,04, I-0,15, B-4,6; концентрирует Mn, особенно Se [221].

Багульник болотный издавна используется в народной медицине благодаря богатому составу активных веществ, оказывающих разностороннее воздействие на организм. Особенно широко он применяется при заболеваниях органов дыхания: бронхитах, трахеитах, ларингитах, пневмонии, бронхиальной астме, гриппе, кашле и коклюше. Эфирное масло оказывает выраженное воздействие на слизистые оболочки дыхательных путей, обладая противокашлевым, отхаркивающим и антисептическим действием. Ещё в 1943 году врач и травник А.П. Татаров отмечал: «С багульником дышать легче», указывая на эффективность его применения при респираторных заболеваниях. Таким образом, багульник болотный обладает высоким лечебным потенциалом благодаря богатому химическому составу, особенно — эфирным маслам, содержащим ценные биологически активные вещества.

Донник лекарственный

Донник, буркун (*Melilotus officinalis*), род двулетних, реже однолетних растений семейства бобовых, объединяет около 20 видов, встречающихся в Европе, Северной и Средней Азии, Северной Африке, Северной Америке и Австралии. На

территории бывшего СССР (в основном на Кавказе) произрастает 11 видов. Стебель донника прямостоячий, ветвистый, обычно гладкий, высотой до 3 м. Листья тройчатые, листочки по краям зубчатые. Соцветие - пазушная кисть с большим количеством мелких жёлтых или белых цветков. Бобы округлые, одно- реже 2–3-семянные. Корневая система мощная, проникает на глубину до 2 м.

В культуре наибольшее распространение получили донник белый (*Melilotus albus*) и донник жёлтый, или лекарственный (*Melilotus officinalis*). Донник зимостоек, засухоустойчив.



Лучше всего растёт на почвах, богатых известью. Засоленные почвы рассаливает, обогащает азотом. Перспективен для освоения солонцовых почв лесостепи, степи и полупустынь. По сравнению с др. бобовыми растениями отличается высокой устойчивостью против болезней и вредителей. Донник - ценное кормовое растение, богатое витаминами и минеральными солями.

Целебные свойства донника лекарственного известны издревле. Его широко применяли в лечебной практике врачеватели многих стран. Донник описан в справочнике лекарственных веществ «De materia medica» древнеримский врач Педаний Диоскорид. Донником лечил раны и увечья гладиаторов римский врач Гален. Знаменитый целитель древности Авиценна (ибн Сина) неоднократно упоминал это растение в своих трудах. Он рекомендовал применять препараты из донника при лечении язв, нарывов, гнойных ран, фурункулов, женских болезней, различных опухолей, в том числе внутренних, для снятия болей, включая головную и суставные.

Современные исследования подтвердили, что мнение медиков древности о доннике лекарственном соответствуют действительности. В растении имеются кумарин, дикумарол, мелилотин, холин, дубильные, слизистые и смолистые

вещества, органические кислоты, микроэлементы, гликозиды, эфирное масло, белок, крахмал.

Химический состав донника белого в начале цветения (%): воды 73,2, протеина 4,4, жира 0,5, клетчатки 9,7, безазотистых экстрактивных веществ 10,5, золы 1,7. В 100 кг зелёной массы содержится 17,5 кормовых единиц и 3,3 кг переваримого протеина; в 100 кг сена 44,0 кормовых единиц и 11,6 кг переваримого протеина. Содержит ароматическое вещество кумарин [222].

Каркаде

Каркаде (*Hibiscus sabdariffa*), также известный как суданская роза, розелла или сирийская роза, — это яркое растение из семейства мальвовых, представленное как однолетними формами, так и многолетними кустарниками (см. рис. П-1). Различные сорта растения используются в разных целях: одни находят применение в лёгкой промышленности (например, для производства бумаги), другие служат исключительно декоративными культурами.

Наибольшее значение для пищевой и медицинской отраслей имеет сорт сабдариффа, из лепестков которого готовят известный напиток каркаде, обладающий освежающим и тонизирующим действием. Этот кустарник культивируется преимущественно в Судане, Египте, Индии, Китае и на Шри-Ланке. Лепестки растения также используются в кулинарии — их добавляют в желе, джемы и варенье. В Древнем Египте настой из гибискуса почитался как универсальное лечебное средство, известное под названием «напиток фараонов».

Химический состав и биологическая активность: Гибискус богат органическими кислотами, включая фенолкарбоновые, винную, лимонную, яблочную и аскорбиновую (витамин С). Кроме того, он содержит аминокислоты, полисахариды, пектин, слизистые вещества, а также значительное количество макро- и микроэлементов.

Особое внимание привлекают флавоноиды, присутствующие в составе растения:

- гибисцетин
- мирицетин
- кверцетин
- гибисцетрин

Ярко-красный цвет напитку из лепестков придают антоцианы, обладающие выраженными антиоксидантными свойствами.

Благодаря богатому составу и наличию биологически активных соединений, каркаде обладает целым рядом полезных свойств, включая антиоксидантное, противовоспалительное, гипотензивное и общеукрепляющее действие. [223].



Рисунок П 1– Гибискус

Муррайя метельчатая

Муррайя метельчатая (*Murraya paniculata*) относится к семейству рутовых и произрастает преимущественно в регионах от Южной Азии до Австралии. Это тропическое вечнозелёное растение с мелкими белыми ароматными цветками, которое часто выращивают в качестве декоративного дерева или живой изгороди. (рис. П-2).



Рисунок П -2 – Муррайя метельчатая

На протяжении многих лет муррайя используется как в декоративных целях, так и в традиционной медицине. Листья растения обладают сильным ароматом и применяются как приправа в индийской и малайской кухне. В народной медицине её используют при болях в животе, дизентерии, головной боли, отеках, тромбозах и нарушениях кровообращения. Ранее было установлено, что экстракты из коры и листьев муррайи обладают стимулирующим, вяжущим, обезболивающим, противовоспалительным, антидиабетическим, антималярийным, антибактериальным, противогрибковым и антиоксидантным действием. Эфирное масло проявляет также противоамебную активность.

Различные исследовательские группы изучали химический состав муррайи, выявляя биологически активные соединения. Плоды и листья растения богаты калием, магнием, железом и фосфором. Фармакологическая активность муррайи обусловлена содержанием таких веществ, как алкалоиды, фенолы, терпеноиды и флавоноиды, которые выделяют из листьев, цветов, плодов и корней растения. Химический состав был определён с использованием хроматографических и спектроскопических методов. Некоторые из обнаруженных соединений обладают

выраженной биологической активностью, что подтверждает традиционное применение растения.

В 1980-х годах были выделены такие соединения, как 3',4',5,5',7,8-гексаметоксифлавоны и 3,3',4',5,5',7,8-гептаметоксифлавоны из метанольного экстракта листьев. Позднее из цветков выделили флавоны 3,5,7,3',4',5'-гексаметоксифлавоны. Также были получены восемь различных флавоноидов из листьев и десять — из кожуры и мякоти плодов. Из листьев были выделены три кумарина: меранзин гидрат, мурпанидин и муррагатин. А из коры корня — такие соединения, как 3-формилиндолин, кумурраин, омфамурин, мурраол, мексотитин, мурангатин и эфиры феруловой кислоты [224].

Лабазник

Лабазник (таволга) (*Filipendula ulmaria*) — многолетнее растение из семейства розоцветных с белыми мелкими цветами в крупных соцветиях. Растет Лабазник на болотах, речных берегах, лугах, цветет с мая по август. В медицине используют цветы, корни, листья растения. Известны такие свойства Лабазника: противовоспалительное, обезболивающее, успокаивающее, мочегонное, противосудорожное, вяжущее, ранозаживляющее, жаропонижающее. В листьях содержатся дубильные вещества, флавоноиды, витамин С, каротин, антоцианы. Собирают и высушивают листья во время цветения растения. В цветах Лабазника содержатся флавоноиды рутин, авикулярин, кверцетин, гликозид спиреин [225].

Кусочки стеблей (зеленовато-коричневого цвета), листьев (темно-зеленых и гладких с верхней стороны, с нижней — волосистых и более светлых, иногда серебристых), цветков и бутонов (желтовато-белого цвета), незрелых плодов (желтовато-коричневого цвета) различной формы, проходящие сквозь сито (5600). Запах метилсалицилата (при растирании цветков). Лабазника вязолистного трава содержит не менее 0,1% эфирного масла, компонентами которого являются

салициловый альдегид, метилсалицилат, бензиловый спирт; фенологликозиды – производные салицилового альдегида (монотропитин), метилсалицилата (спиреин) и салицилового спирта (изосалицин); флавоноиды – производные кверцетина и кемпферола, с преобладанием спиреозида; фенолкарбоновые кислоты (галловую, салициловую), дубильные вещества, а также гепариноподобное вещество в виде комплекса с растительными белками.



Рисунок П -3 – Лабазник

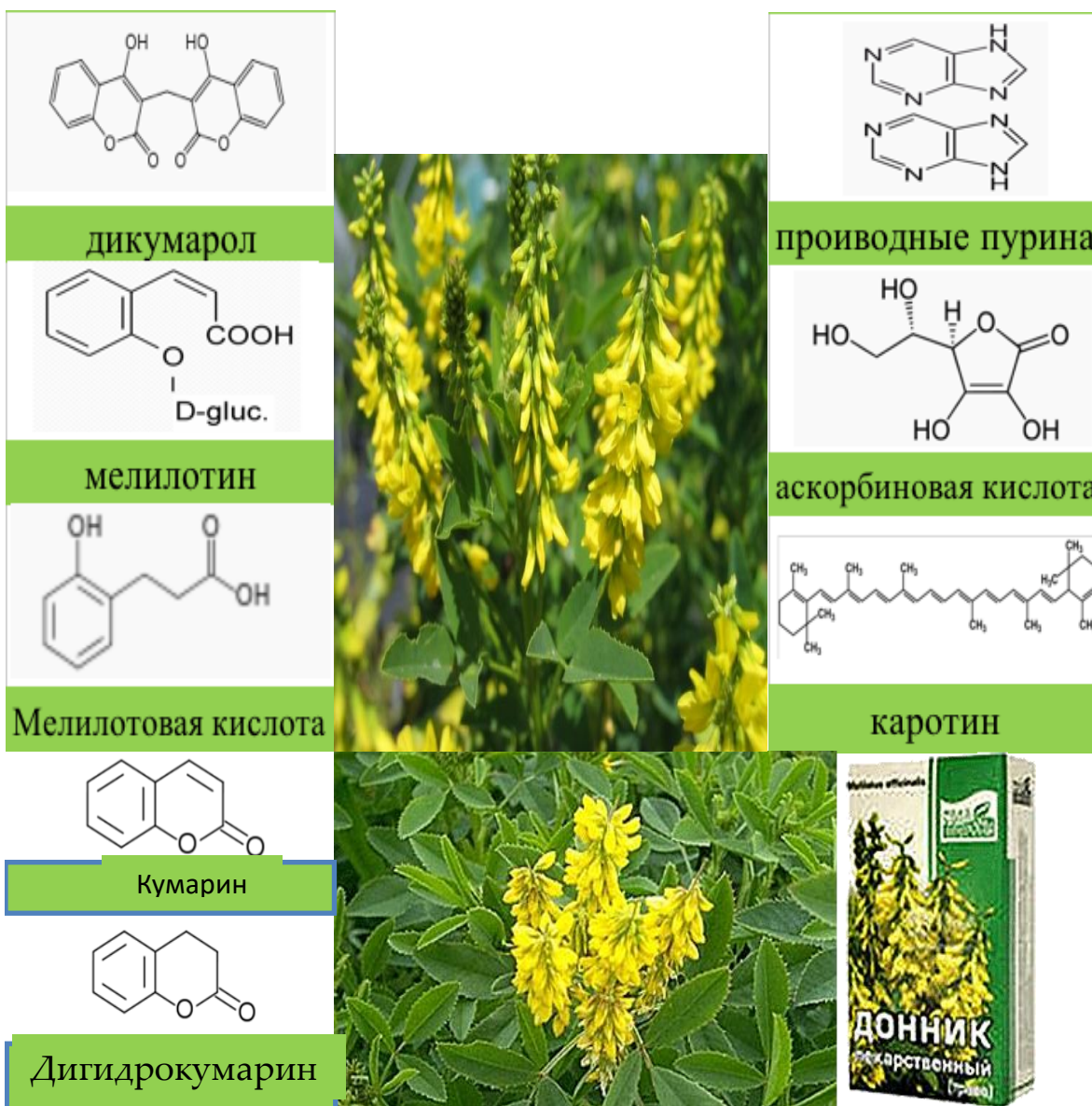
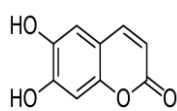
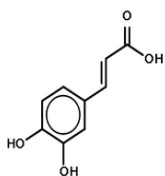


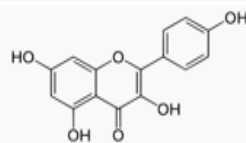
Рисунок П. 4— Донник лекарственный, компонентный состав [53]



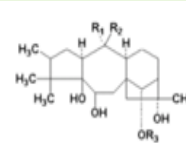
эскулетин



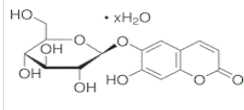
кофейная кислота



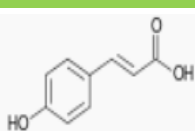
кемпферол



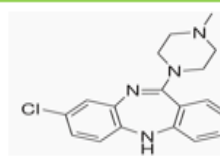
андромедотоксин



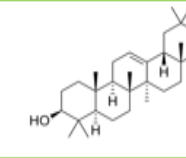
эскулин



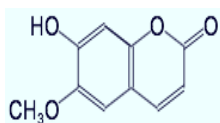
П-кумаровая кислота



азалеатин



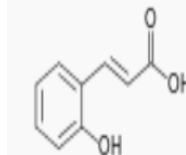
уваол



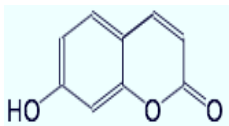
скополетин



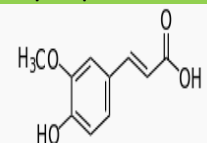
Багуľник болотный



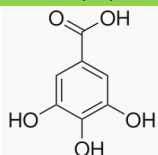
О-кумаровая кислота



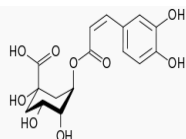
умбеллиферон



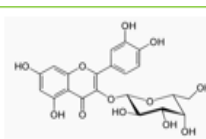
феруловая кислота



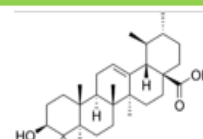
галловая кислота



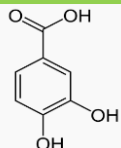
хлорогеновая кислота



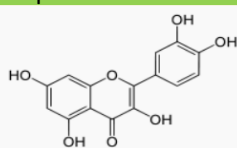
гиперозид



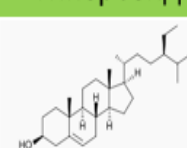
урсоловая кислота



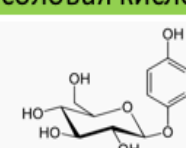
протокатеховая кислота



кверцетин



β-ситостерин



арбутин

Рисунок П. 5 – Багуľник болотный, компонентный состав [226]

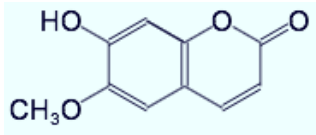
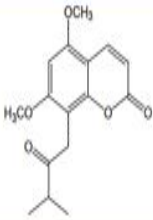

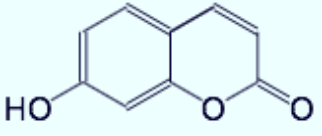
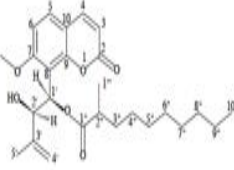
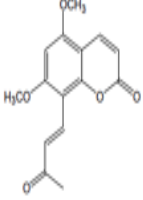

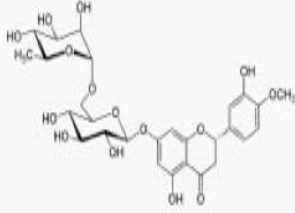
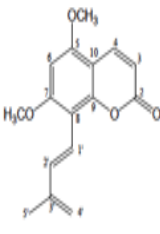

		
<p>скополетин</p>	<p>5,7-dimethoxy-8-(3-methyl-2-oxo-butyl)coumarin</p>	<p>Auraptene</p>
		
<p>умбеллиферон</p>	<p>paniculacin</p>	<p>toddalenone</p>
		
	<p>Гесперидин гикозид</p>	<p>gleanadiene</p>

Рисунок П. 6 – Муррайя метельчатая, компонентный состав

Для фараонов Египта добавляли муррайю в “эликсир жизни”.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева)

ПРИКАЗ

«27» марта 2026 г.

№ 64 ОД

Москва

О правовой охране РИД в качестве секрета
производства (ноу-хау)

На основании протокола Комиссии по интеллектуальной собственности
№ 01/26 от 17.03.2026 года

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Признать сведения в отношении РИД «Способ повышения устойчивости микроорганизмов к действию ионизирующего излучения», содержащиеся на материальном носителе (флеш-накопитель, инвентарный № 02/26) в качестве секрета производства (ноу-хау), правообладателем которого является РХТУ им. Д.И. Менделеева.

2. Ввести в отношении сведений о РИД «Способ повышения устойчивости микроорганизмов к действию ионизирующего излучения» режим коммерческой тайны.

3. Главному бухгалтеру Т.А. Коробовой обеспечить принятие к бухгалтерскому учету права на секрет производства (ноу-хау) «Способ повышения устойчивости микроорганизмов к действию ионизирующего излучения» в качестве нематериального актива с соблюдением законодательно установленных требований.

4. Ответственным лицом за сохранение режима конфиденциальных сведений назначить Панфилова Виктора Ивановича - Заведующего кафедрой биотехнологии РХТУ им. Менделеева.

5. Начальнику Общего отдела А.Г. Нестеровой довести данный приказ до сведения должностных лиц РХТУ им. Д.И. Менделеева в части их касающейся.

6. Контроль за исполнением настоящего приказа оставляю за собой.

И.о. первого проректора



Р.А.Козловский

AKT

To:

First Vice-Rector for Science and Innovation,
MUCTR named after Mendeleev,
Khaidukov E. V.

Date:

Subject: Acceptance of D.Sc. Dissertation for Research and Production Purposes

Dear Evgeny Valeryevich,

We are writing to express our sincere gratitude to you and the Mendeleev University of Chemical Technology of Russia for making available the D.Sc. Dissertation, "Antioxidant properties of plant and microbial preparations and their practical application," authored by Mr. Phyo Myint Oo.

We are pleased to inform you that Myanmar Pharmaceuticals Enterprise (MPE) of the Ministry of Industry of the Republic of the Union of Myanmar has accepted the aforementioned dissertation for use in our research and production processes.

We assure you that the work will be properly acknowledged in any publications or products resulting from our research. We also respect the copyright of Mr. Phyo Myint Oo.

We sincerely value this collaboration and anticipate a successful integration of Mr. Phyo Myint Oo's research into our projects.

Sincerely,

Dr Aung Khine
Managing Director
Myanmar Pharmaceutical Industrial Enterprise

Dr. Aung Khine
Managing Director
Myanmar Pharmaceuticals Enterprise (MPE)
Ministry of Industry
The Republic of the Union of Myanmar



Первому проректору по науке и инновациям

РХТУ им. Менделеева

Хайдукову Е.В.

Дата:

Тема: Принятие диссертации на соискание ученой степени доктора наук для исследовательских и производственных целей

Уважаемый Евгений Валерьевич,

Выражаем Вам нашу искреннюю благодарность Вам и Российскому химико-технологическому университету им. Д.И. Менделеева за предоставление диссертации на соискание ученой степени Доктора наук " Антиоксидантные свойства растительных и микробных препаратов и их практическое применение," автором которой является Пхйьо Мьинт У.

Сообщаем, что Мьянманским Фармацевтическим Предприятием (МРЕ) Министерства промышленности Республики Союз Мьянма принята вышеупомянутая диссертация для использования в наших исследовательских и производственных процессах.

Заверяем, что работа будет должным образом отмечена во всех публикациях или продуктах, являющихся результатом наших исследований. Мы также уважаем авторские права Пхйьо Мьинт У.

Искренне ценим это сотрудничество и надеемся на успешную интеграцию исследований Пхйьо Мьинт У в наши проекты.

С уважением,



Dr Aung Khine
Managing Director

Myanma Pharmaceutical Industrial Enterprise

Доктор Аунг Кхайн

управляющий директор

Мьянманское Фармацевтическое предприятие (МРЕ)

Министерство промышленности

Республика Союз Мьянма

