

## ПОЛИМЕРНЫЕ, БИОРГАНИЧЕСКИЕ И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 544.77.022; 547.022; 549.31

### ОЦЕНКА БИОБЕЗОПАСНОСТИ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩЕГО НАНОКОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДНОЙ МАТРИЦЫ КРАХМАЛА

© 2023 г. М. В. Зверева<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия

\*E-mail: mlesnichaya@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Представлены результаты впервые проведенного исследования биологического действия нанокompозита Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ на здоровые и *Cms*-инфицированные растения картофеля (*Solanum tuberosum*). Установлено, что добавление в среду растений водного раствора стабилизированных крахмалом наночастиц Se<sup>0</sup> со средним размером 22 нм сопровождается отсутствием выраженного отклонения значений количественного содержания промежуточных и конечных продуктов процесса перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов и малонового диальдегида) в листьях от физиологически нормальных в контроле и поддержании физиологического соотношения хлорофилл *a/b* на уровне 1:3, даже в условиях его предварительного нарушения совместно с незначительным (на 30%) повышением содержания общего хлорофилла (как в случае инфицированных растений). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии какого-либо негативного влияния нанокompозита Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ на антиоксидантную систему и фонд хлорофилла в растительном организме, что подтверждает безопасность полученного нанокompозита для растений картофеля.

DOI: 10.56304/S1992722323030160

#### ВВЕДЕНИЕ

Наблюдаемый всплеск интереса к использованию наночастиц селена (Se<sup>0</sup>НЧ) в агробиотехнологиях во всем мире обусловлен в первую очередь их значительным потенциалом в коррекции абиотических и биотических стрессов растений [1, 2]. Селен, являясь эссенциальным элементом, в низких концентрациях снижает количество свободных радикалов в растениях, усиленно продуцирующихся под действием ионов тяжелых металлов (Pb, Cd, As), избыточных концентраций ионов Na<sup>+</sup> в почве, засухи, действия низких температур, органических или неорганических загрязнителей и других патогенов [3]. Подобное протективное действие селена способствует задержке увядания растений, повышению урожайности, увеличению питательной ценности, стимулированию дыхательной активности клеток и усилению метаболических процессов в растительном организме, а также защите растений от патогенов и неблагоприятных факторов среды [4].

Наибольшей биодоступностью среди всех известных форм селена обладают селенат- и селенит-ионы. Однако ввиду их высокой химической и биологической активности и очень узкого “окна” между низкой (при которых наблюдаются все

его положительные перечисленные выше эффекты) и высокой концентрацией селена (с индукцией окислительного стресса и ингибированием ряда ферментных систем в клетках растительного организма) его использование в форме селенат- и селенит-анионов несет значительный риск постоянного превышения допустимых значений концентрации селена [5]. О чрезвычайно высокой химической и биологической активности селенат- и селенит-анионов свидетельствует наличие у них максимальной токсичности в ряду Se-содержащих соединений [5].

Наименее выраженная токсичность при сохранении всего профиля положительных биологических эффектов селена обнаружена для его нуль-валентной наноразмерной формы. Так, в [6–8] представлены результаты исследований по улучшению параметров роста растений, смягчению последствий абиотических стрессов (действие органических и неорганических загрязнителей, солевого стресса, дефицит влаги и др.) в условиях обработки их Se<sup>0</sup>НЧ.

При этом вследствие избытка поверхностной энергии наночастицы (НЧ) являются крайне нестабильными в нормальных условиях материалами и требуют обязательной пассивации поверх-

ности молекулами-стабилизаторами, в частности водорастворимыми полисахаридами, обеспечивая тем самым сохранение наноразмерной дисперсности частиц, а также переводению их в водорастворимое состояние [9]. Водорастворимость (наряду с биологической активностью) является ключевым фактором возможности практического использования наноматериалов в агробиотехнологии и сельском хозяйстве. Среди потенциальных наностабилизирующих матриц особое место занимают природные полисахариды, в том числе коммерчески доступный водорастворимый полисахарид крахмал [10].

Ранее было установлено выраженное антимикробное действие стабилизированных арабиногалактаном НЧ селена в отношении бактериальных фитопатогенов, в частности *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* (*Cms*) [11, 12]. Данный штамм бактерий является возбудителем кольцевой гнили картофеля, поражающей до 70% всего урожая ежегодно [13]. Это значительно расширяет потенциал и области практического применения НЧ селена для комплексного оздоровления растений, в том числе стратегически важной культуры – картофеля. Вследствие чего оценка безопасности  $Se^0HЧ$  в отношении самого растительного организма является необходимым условием их практического использования. Основным критерием данной оценки может являться исследование интенсивности свободнорадикальных процессов, развивающихся в растительном организме в качестве его первичной физиологической реакции в ответ на изменение условий существования (стресс).

Результатом любого стресса является усиление продукции активных форм кислорода (АФК), выполняющих функцию эндогенных сигнальных молекул в клетках, участвующих в развитии устойчивости к стрессору [14]. В то же время избыточная генерация АФК приводит к индукции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и дезэтерификации жирных кислот. Эти процессы приводят к дестабилизации мембран и развитию патологии в условиях воздействия на организм образующего стресс фактора [15]. Первичными продуктами процесса ПОЛ являются диеновые конъюгаты (ДК) жирных кислот. Из полученных ДК после воздействия на них гидроксильных радикалов образуются гидропероксиды липидов. При этом продукты ПОЛ вызывают конформационные изменения фосфолипидов и фосфолипидного комплекса, что приводит к нарушению функций органоидов клетки, органов, а затем и всего растительного организма [16]. В местах присоединения перекисных радикалов к жирным кислотам они разрываются на фрагменты, края которых имеют высокореактивные альдегидные группы. Если разрыв произошел с двух сторон, образуется малоновый диальдегид (МДА), который подавляет

активность многих ферментов, вступая в реакцию с SH- и  $CH_3$ -группами белков. Таким образом, процессы ПОЛ играют существенную роль в регуляции обмена мембранных липидов, изменении физико-химических свойств и проницаемости биологических мембран в физиологических условиях.

Цель данной работы – оценка биобезопасности стабилизированных крахмалом  $Se^0HЧ$  в отношении растений картофеля в условиях их физиологической нормы и инфицирования бактериальным фитопатогеном *Cms*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Водорастворимый картофельный крахмал (Sigma-Aldrich), этанол (Реахим), селен в виде порошка (Вектон), гидрат гидразина (64%) (Реахим), ацетон (Реахим), гексан (Реахим), изопропанол (Реахим), тиобарбитуровая кислота (Вектон), ЭДТА (Sigma-Aldrich) и Тритон X-100 (Sigma-Aldrich) использовали без дополнительной очистки. Для расчета средневязкостной молекулярной массы крахмала по методике [17] использовали величину характеристической вязкости, определенную вискозиметрически в соответствии с протоколом, подробно описанным в [18]. Расчетное значение средневязкостной молекулярной массы используемого в работе крахмала составило 326 кДа.

**Методы исследования.** Микрофотографии  $Se^0HЧ$  в полисахаридной матрице крахмала получали на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) “Leo 906E”. Пробоподготовку образца для микроскопии осуществляли в соответствии с методикой, подробно описанной в [19]. Для измерения размера частиц использовали программу IPWin45. Распределение НЧ по размерам получали с помощью статистической обработки в ручном режиме не менее 7–10 микрофотографий разных полей анализируемой подложки для получения данных о размере 900–1000 частиц.

Элементный состав нанокompозита определяли методом рентгеновского энергодисперсионного микроанализа на электронном сканирующем микроскопе Hitachi TM 3000, оснащенный SDD-детектором XFlash 430-4, и на CHNS-анализаторе Flash 2000 фирмы Thermo Scientific.

Спектры оптического поглощения 0.05%-ного водного раствора нанокompозита регистрировали в интервале длин волн 190–1000 нм на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35 в 1 см кварцевой кювете с использованием дистиллированной воды в качестве раствора сравнения.

Гидродинамические радиусы ( $R_h$ ) стабилизированных крахмалом  $Se^0HЧ$  и макромолекул исходного крахмала определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) на корреляцион-

ном спектрометре Photocor Compact-Z (источник света – термостабилизированный полупроводниковый лазер мощностью 20 мВт с длиной волны  $\lambda = 638$  нм) под углом  $90^\circ$ . Анализ корреляционной функции осуществляли с помощью программы обработки данных ДРС Dynals. Величины  $R_h$  рассчитывали из значений коэффициентов диффузии ( $D$ ) по уравнению Эйнштейна–Стокса:  $R_h = kT/6\pi\eta_0 D^*$  ( $\eta_0$  – вязкость растворителя,  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура). Дисперсность оценивали по стандартной методике с использованием распределения интенсивностей рассеяния в зависимости от значений  $R_h$  НЧ. Растворы для анализа готовили растворением в течение не менее семи часов 5 мг образца в 10 мл дистиллированной воды, предварительно отфильтрованной через шприцевой фильтр. Полученный раствор еще раз очищали фильтрованием через шприцевой фильтр (диаметр пор 0.22 мкм). Время каждого измерения составляло не менее 200 с. Измерения проводили в трехкратной повторности.

Электрофоретическую подвижность НЧ измеряли на спектрометре Photocor Compact-Z с использованием протокола PALS (Phase analysis light scattering). На основании полученных значений скорости движения частиц в поле, рассчитанных из фазовой функции, определяли электрофоретическую подвижность частиц:

$$\mu E = v/E,$$

где  $v$  – скорость движения заряженных частиц в электрическом поле с напряженностью  $E$ . Электрофоретическая подвижность  $\mu E = v/E$  была преобразована в  $\zeta$ -потенциал (потенциал двойного электрического слоя на поверхности) по уравнению Смолуховского:  $\mu E = \varepsilon\varepsilon_0\zeta/\eta_s$ , где  $\varepsilon$  и  $\varepsilon_0$  – диэлектрическая проницаемость растворителя и вакуума соответственно. Каждое измерение проводили в трехкратной повторности, результаты усредняли.

**Синтез  $Se^0$ НЧ в матрице крахмала.** В трехгорлую колбу объемом 50 мл, оборудованную термометром и обратным холодильником, поместили 0.2 г порошка элементного селена, добавили 0.4 мл  $N_2H_4 \cdot H_2O$  и при постоянном перемешивании довели температуру реакционной среды до  $80^\circ C$ . Выдержали данную смесь в течение 30 мин при нагревании и интенсивном перемешивании в атмосфере аргона до полного растворения селена. Полученная смесь имела бордово-красный цвет и содержала ионы  $Se^{2-}$ . Далее аликвоту ( $V = 120$  мкл) реакционной среды, содержащей  $Se^{2-}$ -анионы, добавили к предварительно полученному водному раствору крахмала (3 г в 200 мл  $H_2O$ ) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 20 мин. Выделение целевого нанокompозита и его очистку от примесей побочных продуктов реакции осуществляли осаждением в четырех-

кратный избыток этанола с последующим отделением образовавшегося осадка на фильтре Шотта, его многократной промывкой этанолом и высушиванием на воздухе. Содержание селена в полученном образце составило 2.34 мас. %. Выход – 72%. Найдено (Крахмал– $Se^0$ НЧ), %: С – 39.32, Н – 5.83, Se – 2.34, O – 55.51.

**Влияние нанокompозита Крахмал– $Se^0$ НЧ (2.34% Se) на ПОЛ.** Исследование влияния синтезированного нанокompозита Крахмал– $Se^0$ НЧ (2.34% Se) на содержание основных продуктов ПОЛ в листьях здоровых и инфицированных *Sms* растений картофеля выполнено в условиях введения в жидкую среду роста растений 1 мл стерильных водных растворов опытных образцов (крахмал – 0.1 г/мл, нанокompозит Крахмал– $Se^0$ НЧ (2.34% Se) – 0.045 г/мл,  $SeO_2$  – 0.007 г/мл (в пересчете на селен)), а также аликвоты стерильного раствора дистиллированной воды в контрольных группах. Продолжительность совместной экспозиции 12 ч.

**Содержание диеновых конъюгатов в листьях растений.** Определение содержания первичных продуктов ПОЛ, а именно диеновых конъюгатов, проводили по методике, подробно представленной в [20]. Кратко: 0.15 г листьев растений картофеля измельчали с 2 мл смеси (1 : 1) гексан–изопропанол. Объем довели до 9 мл и выдерживали в течение 15 мин. Затем добавляли 1 мл дистиллированной воды для разделения фаз, снова перемешивали и давали разделиться в течение 30 мин. Затем 0.5 мл гексановой фракции осторожно отбирали сверху, помещали в кювету и добавляли 2.5 мл этанола. Измерения проводили на спектрофотометре UNICO 2802 (США) при длине волны 203 нм. Концентрацию ДК определяли по формуле

$$C_{\text{ДК}} = \left( D \cdot \frac{l}{\varepsilon} \right) \cdot \frac{V}{1000} \cdot m, \quad (1)$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции (для ДК  $2.2 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ );  $l$  – оптический путь, см;  $V$  – объем раствора, мл;  $m$  – масса растительной ткани, г;  $C_{\text{ДК}}$  – концентрация вещества (М). Содержание ДК в растительном материале выражалось в нМ  $г^{-1}$  сухой массы.

**Содержание малонового диальдегида.** Концентрацию МДА в листьях растений картофеля определяли посредством измерения оптической плотности окрашенного триметинового комплекса, образующегося в результате реакции между конечным продуктом процесса перекисного окисления липидов – МДА и тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в области  $\lambda$  532 нм. Спиртовой экстракт листьев для анализа готовили путем гомогенизации 0.15 г ткани листьев экспериментальных растений картофеля с 2 мл 50%-ного этанола. Полученный

гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об./мин. Затем в пробирку с 0.5 мл экстракта последовательно добавляли 0.5 мл 1%-ного раствора Тритон Х-100 в 50%-ном этаноле, 0.2 мл 0.6 М раствора HCl и 0.8 мл 0.06 М рабочего раствора ТБК. Смесь нагревали на водяной бане в течение 15 мин. Охлаждение проводили при 15°C в течение 10 мин. После охлаждения добавляли 0.2 мл 0.005 М раствора этилендиамина тетрауксусной кислоты и 5 мл 96%-ного этанола для стабилизации окраски. Контролем служила пробирка, в которую были добавлены все растворы, кроме анализируемого образца. Концентрацию МДА (мкмоль г<sup>-1</sup> ткани) как конечного продукта процесса ПОЛ рассчитывали по формуле

$$C_{\text{МДА}} = \frac{(D - D_0) \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot \epsilon_{532} \cdot m}, \quad (2)$$

где  $D$  – оптическая плотность в опытном образце;  $D_0$  – оптическая плотность в контрольном образце;  $V_1$  – объем спирта, использованного для гомогенизации, мл;  $V_2$  – объем надосадочной жидкости, внесенной в пробирку, мл;  $V_3$  – объем реакционной смеси, мл;  $m$  – масса исследуемого материала, г;  $\epsilon_{532}$  – коэффициент молярной экстинкции при 532 нм (равен  $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

*Содержание хлорофилла в здоровых и Стс-инфицированных растениях картофеля, обработанных наноконкомпозитом Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ (2.34% Se).* Определение содержания хлорофиллов в опытных растениях проводили в соответствии с методикой, подробно описанной в [21]. Кратко: образец сырой ткани листьев гомогенизировали с 10 мл смеси петролейного эфира и ацетона с последующей экстракцией пигментов неразбавленным ацетоном. После объединения экстрактов смесь доводили до 25 мл путем добавления ацетона и измеряли оптическую плотность полученного раствора при 662 и 644 нм. Концентрацию хлорофилла в растворе рассчитывали с помощью уравнений

$$C_a = (9.784 \cdot E_{662}) - (0.990 \cdot E_{644}), \quad (3)$$

$$C_b = (21.426 \cdot E_{644}) - (4.650 \cdot E_{662}), \quad (4)$$

где  $C_a$  и  $C_b$  – содержание хлорофилла  $a$  и  $b$  соответственно (мг/мл);  $E_{662}$  и  $E_{644}$  – значения оптической плотности общего экстракта пигментов при двух длинах волн, соответствующих максимуму пигментов в данном растворителе.

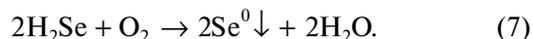
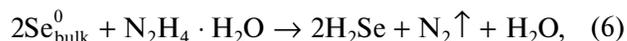
Расчет количества хлорофилла (отдельно хлорофилл  $a$  и  $b$ ) на 1 г сырого веса проводили по формуле

$$A = \frac{C \cdot V}{1000 \cdot a}, \quad (5)$$

где  $A$  – количество хлорофилла  $a$  и  $b$ , мг г<sup>-1</sup>, сырого веса;  $C$  – концентрация пигментов, мг л<sup>-1</sup>;  $V$  – объем экстракта, мл;  $a$  – вес в граммах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез Se<sup>0</sup>НЧ выполнен в водном растворе крахмала в результате мягкого окисления селенид-анионов, предварительно сгенерированных посредством восстановления селена гидратом гидразина в инертной атмосфере согласно модифицированной методике, подробно представленной в [22]. В целом процесс протекает по двум реакциям



На первом этапе происходят растворение порошка элементарного селена и его восстановление до селеноводорода, который, обладая более высокой, чем сероводород, кислотностью ( $pK_a$  3.89), растворяется в воде и образует раствор селеноводородной кислоты, используемый в работе для синтеза НЧ селена (1). Синтез в атмосфере аргона предотвращает предварительное нежелательное окисление селенид-анионов и способствует снижению потерь прекурсора селена. Введение аликвоты полученной реакционной среды, содержащей селенид-анионы, в водный раствор крахмала приводит к их окислению до атомов селена Se<sup>0</sup> молекулярным кислородом воздуха, пропускаемого через реакционную смесь (2). При этом единственными побочными продуктами данного синтеза на всех его этапах являются абсолютно экологичные молекулярный азот и вода. В результате коалесценции атомы селена образуют зародыши новой фазы, растущие и созревающие далее в Se<sup>0</sup>НЧ. Стабилизация поверхности сформировавшихся Se<sup>0</sup>НЧ и обеспечение их агрегативной устойчивости обуславливаются адсорбцией макромолекул крахмала на их поверхности, что приводит к возникновению защитной оболочки, обладающей механической прочностью и упругостью. Основным условием стабилизации является избыток макромолекул крахмала, необходимый для образования моно- или полислоя его макромолекул на поверхности Se<sup>0</sup>НЧ [23]. Реализация данного механизма обуславливает структурно-механический фактор устойчивости стабилизированных крахмалом Se<sup>0</sup>НЧ, полностью предотвращающий коагуляцию частиц.

Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии наноконкомпозит Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ формируется в виде распределенных в полисахаридной матрице крахмала электроконтрастных частиц с формой, приближенной к сферической (рис. 1а). Размер НЧ варьирует в интервале 14–37 нм (рис. 1б) со средним значением 22 нм.

Близкий к нормальному тип дисперсного распределения НЧ указывает на то, что в основе механизма их роста и созревания лежит последова-

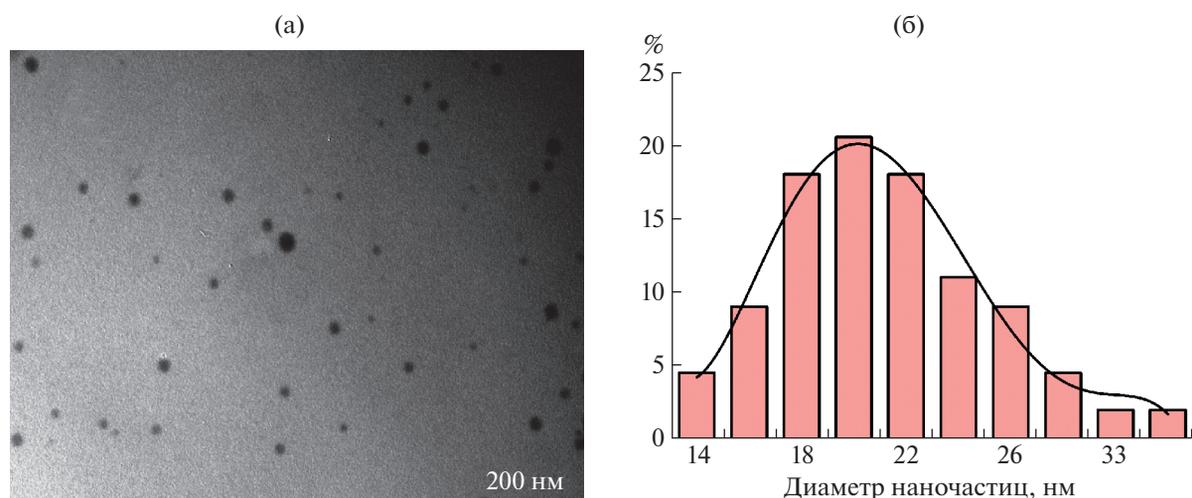


Рис. 1. ПЭМ-изображение (а) и диаграмма дисперсного распределения (б)  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  в матрице крахмала.

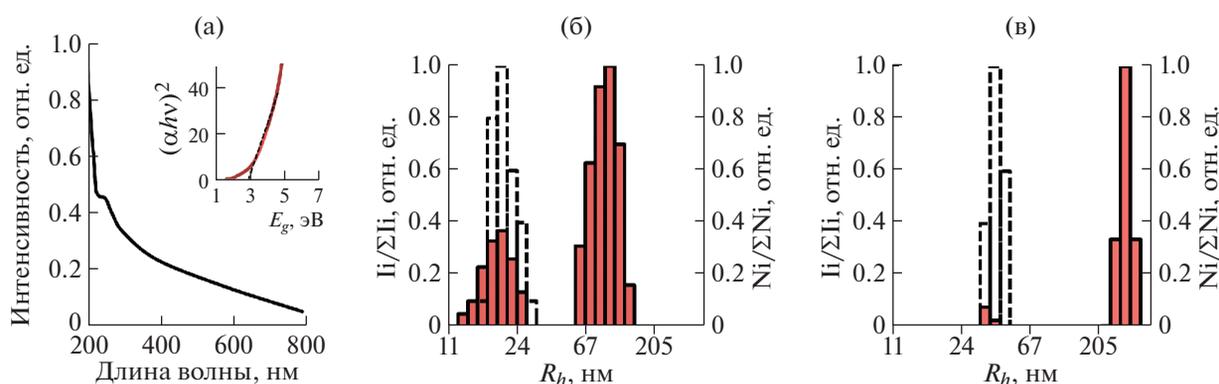


Рис. 2. Спектр поглощения 0.05%-ного водного раствора стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  (а), на вставке представлена спектральная зависимость коэффициента поглощения в координатах Таус для данного композита; распределение интенсивности рассеяния света по значениям гидродинамических радиусов ( $R_h$ ) в образцах исходного крахмала (б) и стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  (в).

тельное присоединение атомов селена к поверхности растущей частицы, а не стохастическая агрегация сформированных НЧ [24]. Приближенность формы НЧ к сферической предположительно обусловлена стремлением к самопроизвольному снижению поверхностной энергии формирующихся частиц и отсутствием в реакционной среде условий для их анизотропного роста [25].

Спектр поглощения 0.05%-ного водного раствора нанокompозита характеризуется монотонным подъемом из низкоэнергетической в высокоэнергетическую область спектра и наличием уширенного максимума в области 255 нм (рис. 2а), а также плато меньшей интенсивности в области ~520–540 нм. При этом максимум поглощения может быть обусловлен межполосным и основным электронными переходами в НЧ селена, в то время как плато в видимой области может быть

обусловлено поверхностным плазмонным резонансом [26].

Оптическую ширину запрещенной зоны ( $E_g$ ) стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  определяли экстраполяцией к оси абсцисс линейного участка спектра поглощения данного нанокompозита, представленного в координатах Таус [27]. Установлено, что значение  $E_g$  для полученных  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  составило 3.0 эВ (рис. 2а, вставка), что намного превышает значение  $E_g$  для объемного образца аморфного селена (1.6–2.03). Подобное увеличение значения  $E_g$ , характерное для наноразмерного состояния материала по сравнению с его объемной (bulk) формой, обусловлено проявлением квантово-размерного эффекта – эффекта квантового удержания (quantum confinement effect), и хорошо соотносится с полученными в [28]

данными для  $\text{Se}^0\text{НЧ}$ , стабилизированных полисахаридной матрицей  $\kappa$ -каррагинана.

Исследование водных растворов стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  методом ДРС позволило установить, что эти коллоиды характеризуются бимодальным типом распределения интенсивностей рассеяния с выраженным выделением двух фракций частиц (рис. 2б). Так, установлено, что в водном растворе исходного крахмала присутствуют две фракции частиц – быстрая со средним значением  $R_h$  18 нм, вероятно, принадлежащая макромолекулам амилозы, вышедшим из гранул крахмала в процессе его пробоподготовки, и медленная с  $R_h$  90 нм, принадлежащая агрегатам амилозы или амилопектина [29]. Присутствие в водном растворе крахмала достаточно крупных частиц со средним значением  $R_h$  90 нм, предположительно, обусловлено агрегационными процессами между макромолекулами амилозы или амилопектина (крахмала) в растворе [30]. Насыщенность макромолекул полисахаридов гидроксильными группами способствует их вовлечению в образование водородных связей, а также их участию в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях даже в хороших растворителях, что неизбежно приводит к образованию прочных ассоциатов и метастабильных агрегатов [31]. Переход к распределению по числу рассеивающих частиц сопровождается изменением его характера, а именно выделением только одной фракции частиц со средним значением  $R_h$  18, вследствие преобладания данной фракции частиц в объеме анализируемого раствора по сравнению с крупноразмерными межмолекулярными ассоциатам и агрегатами, присутствующими в растворе в малом количестве. В водном растворе нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  присутствуют также две фракции частиц, однако их средняя величина  $R_h$  значительно выше, чем у частиц в исходном крахмале – 28 и 260 нм для быстрой и медленной фракции соответственно (рис. 2в). Подобное увеличение среднего значения  $R_h$  частиц фракций, выделенных в нанокompозите, вероятнее всего свидетельствует о формировании единой гибридной органо-неорганической системы типа ядро/оболочка – “ $\text{Se}^0\text{НЧ}$ /полисахаридная матрица крахмала”, идентифицируемой как быстрая фракция с возможным участием полученных стабилизированных крахмалом  $\text{НЧ}$  в образовании ассоциатов и агрегатов (медленная фракция). По аналогии с исходным полисахаридом крахмалом переход к распределению по числу рассеивающих частиц сопровождается выделением только одной фракции частиц со средним значением  $R_h$  30 нм, преобладающей в объеме анализируемого раствора.  $\zeta$ -потенциал водного раствора стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  составил –18 мВ в сравнении с –4 мВ для водного раствора крахмала. Значительный рост значения

$\zeta$ -потенциала в нанокompозите по сравнению с исходным крахмалом, предположительно, обусловлен формированием двойного электрического слоя на поверхности  $\text{Se}^0\text{НЧ}$ , в частности присутствующими на их поверхности потенциалопределяющими ионами  $\text{Se}^{2-}$ , сорбировавшимися из реакционной среды во время синтеза нанокompозита. В целом полученная величина  $\zeta$ -потенциала стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  свидетельствует об их ограниченной устойчивости, вследствие чего дальнейшие эксперименты по определению биологического влияния полученного нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  на растения проводили со свежеприготовленными водными растворами.

Результаты определения содержания ДК в листьях растений картофеля после выращивания на питательных средах с добавлением нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$ , крахмала и  $\text{SeO}_2$  для сравнения представлены на рис. 3а. Согласно полученным данным количество ДК в листьях здоровых растений составляло  $0.152 \text{ мкМ г}^{-1}$  (сухой вес) с небольшими (10–15%) отклонениями от этого значения в обе стороны. Такое содержание ДК в живом растении может быть обусловлено рядом естественных свободнорадикальных процессов, сопровождающих метаболизм любого организма. Инкубация экспериментальных растений в течение 12 ч со стерильными растворами  $\text{SeO}_2$  (для сравнения), крахмала и нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  сопровождалась колебаниями количественного содержания ДК в листьях растений. Так, обработка здоровых растений раствором  $\text{SeO}_2$  приводила к повышению уровня ДК на 50% (до  $0.225 \text{ мкМ г}^{-1}$ ) по сравнению с контролем. Предположительно, это обусловлено взаимодействием ионов селена с мембранными белками клеток с последующей их инактивацией и запуском каскада реакций, включающих в себя передачу сигналов или ПОЛ, направленных на нейтрализацию стрессора (в данном случае избытка ионов селена), действующего на здоровый, нормально функционирующий растительный организм [32]. Тогда как добавление в среду роста растений стерильных растворов чистого крахмала или нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  сопровождается незначительным повышением уровня ДК до  $0.189$  и  $0.174 \text{ мкМ г}^{-1}$  в их листьях. Однако наблюдаемые колебания уровня ДК в этом случае находятся практически в диапазоне ошибок уровня ДК контрольных растений. Это не позволяет в полной мере судить об их действии на растения картофеля.

Аналогичный эксперимент, но с *Cms*-инфицированными растениями показал значительное повышение уровня ДК (до  $0.209 \text{ мкМ г}^{-1}$ ) в листьях картофеля контрольной группы. Вероятно,

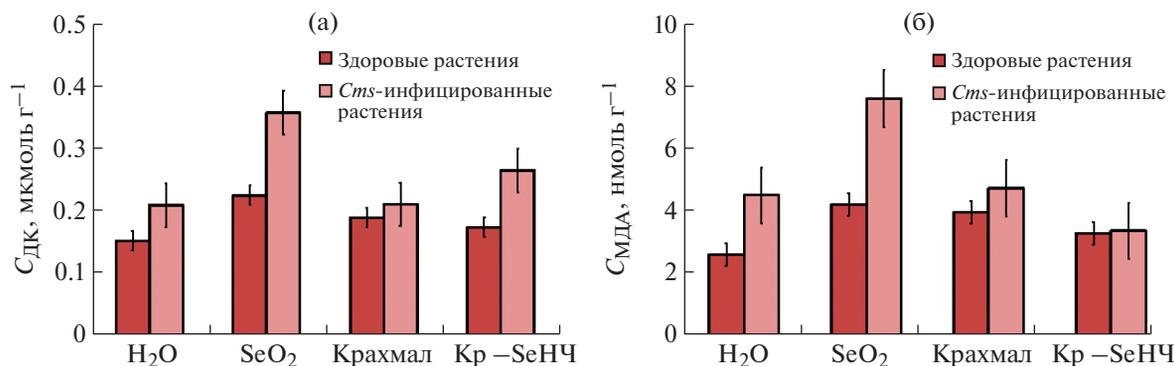


Рис. 3. Содержание продуктов перекисного окисления липидов: ДК (а) и МДА (б) в листьях здоровых и *Cms*-инфицированных растений картофеля после 12-часовой экспозиции с тестовыми растворами.

это обусловлено активацией естественных защитных механизмов растений, включающих в себя активную продукцию АФК для нейтрализации патогенных агентов (в данном случае бактерий *Cms*), и запуском каскада реакций ПОЛ.

Тенденция к повышению уровня ДК при обработке SeO<sub>2</sub> в здоровых и зараженных растениях (0.357 мкМ г<sup>-1</sup>) свидетельствует об участии селена в инициации ряда сигнальных реакций, продуктами которых являются ДК. Высокая окислительная активность иона Se<sup>+4</sup> может лежать в основе его взаимодействия с белковыми фрагментами клеточных стенок растений картофеля, вызывая замещение серы в сульфидрильных группах белков и утрату ими функций, обеспечивающих целостность клеточной стенки [33]. В то же время столь высокая концентрация ДК в группе зараженных растений, обработанных SeO<sub>2</sub>, может быть обусловлена сочетанием реакции растительного организма на заражение *Cms* и избыток ионов селена. Добавление раствора крахмала в среду роста *Cms*-инфицированных растений, как и в случае здоровых, не сопровождалось повышением уровня ДК в листьях и сохраняло свое значение на уровне контрольной группы (0.211 мкМ г<sup>-1</sup>). Добавление в среду роста *Cms*-инфицированных растений нанокompозита Крахмал-Se<sup>0</sup>НЧ сопровождается незначительным повышением уровня ДК до 0.265 мкМ г<sup>-1</sup>, вероятно, вследствие пролонгированного высвобождения с поверхности НЧ небольшого количества ионов Se<sup>4+</sup> в процессе их совместной инкубации в среде роста растений, а также их взаимодействия с растительными клетками по типу ионов селена из SeO<sub>2</sub>, однако в гораздо меньшей концентрации. Отметим, что полученное значение содержания ДК в листьях *Cms*-инфицированных растений (0.265 мкМ г<sup>-1</sup>) в этом случае лишь незначительно превышает концентрацию ДК в контрольной группе (0.209 мкМ г<sup>-1</sup>), что также не позволяет в полной мере судить о достоверности выводов о

влиянии нанокompозита Крахмал-Se<sup>0</sup>НЧ на продукцию ДК растениями. В то же время ДК является промежуточным продуктом процесса ПОЛ, токсичность и реактогенность которого значительно ниже, чем конечного продукта этого процесса – МДА.

Средняя концентрация МДА в контрольной группе растений составила 2.6 и 4.5 нмоль г<sup>-1</sup> для здоровых и инфицированных соответственно (рис. 3б). Повышенное значение концентрации МДА во втором случае было обусловлено активацией естественных процессов усиленной генерации АФК в клетках растений, направленных на нейтрализацию патогена (бактерий *Cms*). Введение SeO<sub>2</sub> в среду роста здоровых растений картофеля сопровождается 1.65-кратным увеличением содержания МДА в листьях. Для инфицированных растений соблюдается та же тенденция, даже на фоне изначально большего количества МДА по сравнению со здоровыми растениями, вероятно, как и в случае с ДК, вследствие действия на растительный организм сразу нескольких повреждающих факторов (инфекция и избыток ионов селена). Внесение стерильного водного раствора крахмала в ростовую среду здоровых растений картофеля сопровождалось значительным (в 1.5 раза) увеличением концентрации МДА в листьях. Предположительно, это было вызвано кратковременной интенсификацией процессов ПОЛ в ответ на внесение полисахаридных молекул. В группе *Cms*-инфицированных растений, обработанных крахмалом, не наблюдалось каких-либо значимых отклонений величины содержания МДА (4.73 нмоль г<sup>-1</sup>) от контроля, что свидетельствует об отсутствии реакции со стороны *Cms*-инфицированного растительного организма, находящегося в стадии активной борьбы с бактериальными патогенами *Cms*, на введение слабopровоцирующего фактора (раствор крахмала).

**Таблица 1.** Содержание хлорофилла *a* и *b* и их соотношение в листьях здоровых и зараженных растений

	Контроль	SeO <sub>2</sub>	Крахмал	Крахмал–Se <sup>0</sup> НЧ
Здоровые растения				
Хлорофилл <i>a</i> , мг г <sup>-1</sup>	0.714	1.23	0.8	1.38
Хлорофилл <i>b</i> , мг г <sup>-1</sup>	0.254	0.712	0.25	0.43
Общий хлорофилл ( <i>a</i> + <i>b</i> ), мг г <sup>-1</sup>	0.968	1.942	1.05	1.81
Хлорофилл <i>a/b</i>	2.8	1.72	3.2	3.18
<i>Cms</i> -инфицированные растения				
Хлорофилл <i>a</i> , мг г <sup>-1</sup>	0.256	0.354	0.295	0.339
Хлорофилл <i>b</i> , мг г <sup>-1</sup>	0.093	0.158	0.101	0.117
Общий хлорофилл ( <i>a</i> + <i>b</i> ), мг г <sup>-1</sup>	0.349	0.512	0.396	0.456
Хлорофилл <i>a/b</i>	2.72	2.2	2.9	2.9

Добавление наноконкомпозита Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ в среду роста здоровых растений сопровождалось незначительным (в 1.3 раза) увеличением концентрации МДА по сравнению с контролем. Причиной данного повышения уровня МДА может являться, как и в случае с ДК, естественная реакция растительного организма на чужеродный агент, в качестве которого могут выступать ионы Se<sup>4+</sup>, медленно выделяющиеся с поверхности НЧ в процессе их совместной экспозиции. Тогда как введение наноконкомпозита Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ в среду роста *Cms*-инфицированных растений сопровождалось снижением уровня МДА в их листьях до значений 3.36 нмоль г<sup>-1</sup>, что в 1.35 раза меньше, чем в контрольной группе. Медленно высвобождающиеся с поверхности НЧ ионы Se<sup>4+</sup> могут ингибировать рост *Cms* вследствие наличия у Se<sup>0</sup>НЧ антимикробной активности в отношении данного бактериального фитопатогена, что было показано в [11, 12]. Замедление темпов роста бактерий *Cms* приводит к снижению микробной нагрузки на растительный организм с уменьшением продукции защитных и сигнальных свободнорадикальных продуктов, трансформирующихся в процессе своего метаболизма до наиболее агрессивного МДА.

В дополнение к описанному выше исследованию безопасности наноконкомпозита Крахмал–Se<sup>0</sup>НЧ для растительного организма картофеля изучили влияние обработки растений наноконкомпозитом, а также исходным крахмалом и SeO<sub>2</sub> (для сравнения) на содержание хлорофилла в листьях. Установлено, что количество хлорофилла *a* и *b* в листьях здоровых растений составило 0.714 и 0.254 мг г<sup>-1</sup> соответственно. Соотношение данных видов хлорофилла (1 : 2.8) было близко к физиологической норме (примерно 1 : 3). В листьях *Cms*-инфицированных растений содержание всех видов хлорофилла падает до общего значения

0.39 с отклонением соотношения хлорофилл *a/b* до 1 : 2.7. Причиной снижения общего количества хлорофилла в данном случае может являться разрушение пигмента, а именно хлорофилл-белкового комплекса протеолитическими ферментами бактерий *Cms*. Результатом работы протеаз *Cms* являются изменение структуры белковой стромы пластид и отделение хлорофилла от мембран [34]. Кроме того, уменьшение концентрации хлорофилла в растениях при их *Cms*-инфицировании может быть обусловлено значительным замедлением фотопревращения содержащегося в листьях протохлорофиллида в бесфитольное производное хлорофилла – хлорофиллид, т.е. происходит нарушение биосинтеза данного пигмента на его заключительном этапе [35].

Однократная обработка здоровых или *Cms*-инфицированных растений картофеля оксидом селена в конечной концентрации по селену 0.007 г/мл приводит к отклонению соотношения хлорофилла *a/b* от стандартного до 1 : 1.7 и 1 : 2.2 соответственно на фоне увеличения общего количества хлорофилла в обоих случаях. Предположительно, это обусловлено развитием компенсаторных метаболических процессов под влиянием избытка селена в среде роста растений, приводящих к увеличению общего количества хлорофилла (табл. 1). Это может привести к краткосрочному увеличению фотосинтетической способности, антиоксидантной активности и ускорению роста растений, что наблюдалось в [32, 36]. Увеличение доли хлорофилла *b* в общем фонде предположительно связано с окислением хлорофилла под действием АФК, генерируемых растительными клетками в ответ на изменение условий их жизни (в данном случае – внесение ионов Se<sup>4+</sup>) [37].

Введение крахмала в среду роста здоровых или инфицированных растений характеризуется отсутствием значимых отличий полученных значений концентрации хлорофилла *a*, *b*, их общего

количества и соотношения  $a/b$  от значений в соответствующих контрольных группах. Тогда как внесение нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  характеризовалось преимущественным сохранением соотношения хлорофилл  $a/b$  на уровне 1 : 3, в том числе для инфицированных растений. Общее содержание хлорофилла в листьях инфицированных растений при этом было значительно (в 4 раза) снижено по сравнению со здоровыми растениями даже в условиях их обработки нанокompозитом.

В группе *Cms*-инфицированных растений, инкубированных с нанокompозитом Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$ , можно отметить незначительное (на 30%) повышение содержания общего хлорофилла по сравнению с контрольной группой на фоне “выравнивания” соотношения хлорофилл  $a/b$  до контрольных значений. Отметим, что обработка растений стабилизированными крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  характеризуется отсутствием какого-либо негативного влияния на содержание хлорофилла и соотношение его видов в листьях растений. Кроме того, такая обработка способствует сохранению хлорофилловых фондов на уровне контрольных интактных растений, что еще раз подтверждает безопасность полученного нанокompозита для растений картофеля.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые осуществлен синтез стабилизированных крахмалом  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  с использованием в качестве селенового прекурсора высокорекреационно-способных селенид-анионов, предварительно сгенерированных восстановлением элементного селена гидратом гидразина. С использованием комплекса современных физических методов исследования установлено, что нанокompозит Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  формируется в виде распределенных в полисахаридной матрице частиц размером 14–37 нм и формой, приближенной к сферической. Обнаружено, что в водном растворе полученного нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  присутствуют две фракции частиц со средними значениями  $R_h$  28 и 260 нм. Предположительно выделенные фракции могут соответствовать НЧ селена, поверхность которых покрыта слоем макромолекул крахмала (быстрая фракция) с формированием единой гибридной органо-неорганической системы типа ядро/оболочка – “ $\text{Se}^0\text{НЧ}$ /полисахаридная матрица крахмала”, и агрегатам таких частиц (медленная фракция). В условиях *in vivo* обнаружено различие биологических действий нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  на здоровый и *Cms*-инфицированный растительный организм. Так, добавление в среду роста здоровых растений картофеля водного раствора нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  сопровождалось незначительным увеличением концентрации ДК и МДА по сравнению с кон-

тролем, вероятно, вследствие развития естественной реакции растительного организма на чужеродный агент, в качестве которого выступают ионы  $\text{Se}^{4+}$ , медленно выделяющиеся с поверхности НЧ в процессе их совместной экспозиции. Тогда как введение нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  в среду роста *Cms*-инфицированных растений сопровождалось незначительным повышением (в 1.26 раза) уровня ДК и 1.35-кратным снижением уровня МДА в их листьях, вследствие ингибирования роста *Cms* медленно высвобождающимися с поверхности НЧ ионами  $\text{Se}^{4+}$ , благодаря наличию у  $\text{Se}^0\text{НЧ}$  антимикробной активности в отношении данного бактериального фитопатогена. Кроме того, установлено, что внесение нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  к здоровым и *Cms*-инфицированным растениям картофеля характеризовалось преимущественным сохранением и поддержанием физиологического соотношения хлорофилл  $a/b$  на уровне 1 : 3 даже в условиях его предварительного нарушения совместно с незначительным (на 30%) повышением содержания общего хлорофилла (как в случае инфицированных растений). Данные результаты свидетельствуют об отсутствии какого-либо негативного влияния полученного нанокompозита Крахмал– $\text{Se}^0\text{НЧ}$  на антиоксидантную систему и фонд хлорофилла в растительном организме, что еще раз подтверждает безопасность нанокompозита для растений картофеля.

Автор выражает благодарность А.И. Перфильевой и О.А. Ножкиной (сотрудникам СИФБР СО РАН) за предоставленные образцы здоровых и *Cms*-инфицированных растений картофеля.

В экспериментах использовали материалы и оборудование БАЦКП Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *El-Ramady H., Domokos-Szabolcsy E., Shalaby T. et al. // Selenium in Agriculture: Water, Air, Soil, Plants, Food, Animals and Nanoselenium. Springer, Cham. 2015. P. 217. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-11906-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11906-9_5)*
2. *Girling C.A. // Agric. Ecosyst. Environ. 1984. V. 11. P. 37. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(84\)90047-1](https://doi.org/10.1016/0167-8809(84)90047-1)*
3. *Gupta M., Gupta S. // Front Plant Sci. 2017. V. 11. P. 2074. <https://doi.org/10.3389%2Ffpls.2016.02074>*
4. *Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Raza A. et al. // Plants (Basel). 2020. V. 4. P. 1711. <https://doi.org/10.3390/plants9121711>*
5. *Rahman M.M., Asiri A.M., Khan A. et al. Importance of Selenium in the Environment and Human Health [Internet]. London: IntechOpen, 2020. 94 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83202>*

6. *Gudkov S.V., Shafeev G.A., Glinushkin A.P. et al.* // ACS Omega. 2020. V. 5. P. 17767.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02448>
7. *Garza-Garcia J.J.O., Hernandez-Diaz J.A., Zamudio-Ojeda A. et al.* // Biol Trace Elem Res. 2022. V. 200. P. 2528.  
<https://doi.org/10.1007/s12011-021-02847-3>
8. *Bano I., Skalickova S., Sajjad H. et al.* // Agronomy. 2021. V. 11. P. 2229.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy11112229>
9. *Pomogailo A.D., Dzhardimalieva G.I.* Nanostructured Materials Preparation via Condensation Ways. Dordrecht: Springer, 2014. 460 p.  
<https://doi.org/10.1007/978-90-481-2567-8>
10. *Osdaghi E., Van der Wolf J.M., Abachi H. et al.* // Mol. Plant. Pathol. 2022. V. 23. P. 911.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.13191>
11. *Baharuddin A., Paborong A., Kuswinanti T. et al.* // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2019. V. 355. P. 012081.
12. *Hukkanen A., Karjalainen R., Nielsen S. et al.* // J. Plant Dis. Prot. 2005. V. 112. P. 88.
13. *Schneider B.J., Zhao J., Orser C.S.* // FEMS Microbiol. Lett. 1993. V. 109. P. 207.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06169.x>
14. *Tripathy B.C., Oelmuller R.* // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 1621.  
<https://doi.org/10.4161/psb.22455>
15. *Das K., Roychoudhury A.* // Front. Environ. Sci. 2014. V. 2.  
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
16. *Smirnoff N., Arnaud D.* // New Phytologist. 2019. V. 221. P. 1197.  
<https://doi.org/10.1111/nph.15488>
17. *Dokic P., Dokic L., Dapcevic T. et al.* // Prog. Colloid Polym. Sci. 2008. V. 135. P. 48.
18. *Лесничая М.В., Александрова Г.П., Сухов Б.Г. и др.* // Химия природных соединений. 2013. Т. 49. С. 347.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-013-0625-x>
19. *Лесничая М.В., Сухов Б.Г.* // Российские нанотехнологии. 2021. Т. 16. С. 222.  
<https://doi.org/10.1134/S1992722321020096>
20. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
21. *Филипцова Г.Г.* Фотосинтез: методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов биологических факультетов. Минск: БГУ, 2017. 40 с.
22. *Lesnichaya M., Gazizova A., Perfilova A. et al.* // IET Nanobiotechnol. 2021. V. 15. P. 585.  
<https://doi.org/10.1049/nbt2.12044>
23. *Лесничая М.В., Мальшиева С.Ф., Белогорлова Н.А. и др.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2019. Т. 68. С. 2245.  
<https://doi.org/10.1007/s11172-019-2694-x>
24. *Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В.* // Успехи химии. 2011. Т. 80. С. 635.  
<https://doi.org/10.1070/RC2011v080n07ABEH004201v>
25. *Nguyen T.K., Maclean N., Mahiddine S.* // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 7610.  
<https://doi.org/10.1021/cr400544s>
26. *Singh S.C., Mishra S.K., Srivastava R.K. et al.* // J. Phys. Chem. 2010. V. 114. P. 17374.  
<https://doi.org/10.1021/jp105037w>
27. *Зверева М.В., Жмурова А.В.* // Журн. орган. химии. 2022. Т. 92. С. 1628.  
<https://doi.org/10.1134/S1070363222100139>
28. *Lesnichaya M.V., Shendrik R., Sukhov B.G.* // J. Lumin. 2019. V. 211. P. 305.  
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2019.03.056>
29. *Chakraborty S., Sahoo B., Teraoka I. et al.* // Carbohydr. Polym. 2005. V. 60. P. 475.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.011>
30. *Casillo A., Fabozzi A., Russo Krauss I. et al.* // Biomacromolecules. 2021. V. 12. P. 1445.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01659>
31. *Burchard W.* Light Scattering from Polysaccharides as Soft Materials // Soft Matter Characterization. Eds. Borsali R., Pecora R. Dordrecht: Springer, 2008.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4465-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4465-6_9)
32. *Jiang C., Zu C., Lu D. et al.* // Sci Rep. 2017. V. 7. P. 42039.  
<https://doi.org/10.1038/srep42039>
33. *Lesnichaya M., Perfilova A., Nozhkina O. et al.* // J. Trace Elem. Med. Biol. 2022. V. 69. P. 126904.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126904>
34. *Padmaja K., Prasad D.D.K., Prasad A.R.K.* // Phytochemistry. 1989. V. 28. P. 3321.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80339-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80339-5)
35. *Лемеза Н.А., Гирилович И.С.* // Вестн. Белорус. гос. ун-та им. В.И. Ленина. Сер. 2, Химия. Биология. География. 1991. Т. 2. С. 45. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/254761>
36. *Вихрева В.А., Балахнина Т.И., Гинс В.К.* // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2002. Т. 1. С. 8.
37. *Zahedi S.M., Moharrami F., Sarikhani S. et al.* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 17672.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74273-9>