

УДК 663.126:547.1¹:123

Я.Б. ДРЕВКО^{1,*}, Т.С. СИТНИКОВА¹, А.М. БУРОВ², Б.И. ДРЕВКО¹, С.Ю. ЩЕГОЛЕВ²

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов 410012

² ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН», Саратов, 410049

e-mail: drevko@list.ru

Восстановление диацетофенонилселенида (препарат ДАФС-25) до ацетофенона с образованием микро- и наночастиц селена в присутствии культуры *Saccharomyces cerevisiae*

Обнаружено, что в присутствии культуры *Saccharomyces cerevisiae* препарат ДАФС-25 подвергался восстановлению с образованием ацетофенона и элементарного селена, представленного в виде нано- и микрочастиц шарообразной формы размером 50—400 нм, содержащих селен. Селенит натрия в подобных условиях восстанавливался с образованием игольчатых частиц селена длиной до 500 нм. При этом скорость трансформации препарата, полученного при использовании культуральной жидкости дрожжей, не изменялась в зависимости от состава питательной среды.

Ключевые слова: восстановление, наночастицы селена, препарат ДАФС-25 (диацетофенонилселенид), *Saccharomyces cerevisiae*.

Известно, что препарат ДАФС-25 (диацетофенонилселенид, Селенолин, Селенобел) применяется для восполнения дефицита селена в организме человека и животных, как средство для лечения и профилактики инфекционных заболеваний и отравлений и как добавка к различным продуктам питания [1, 2]. Следует отметить, что для восполнения дефицита селена в организме в мировой практике применяют также препарат 9-фенил-симм. октагидроселеноксантен (Селен-Актив, Селенопирин, Селенес) [3], селенит натрия [4, 5] и некоторые другие препараты. В последние годы ведутся работы по созданию селенсодержащих биомедицинских препаратов на основе наночастиц селена, используемых, в частности, для адресной доставки в организме лекарств и иных биологически активных соединений [6, 7].

Обычно препарат ДАФС-25 вводится в организм человека и животных перорально. Кроме того, в последнее время проводят работы по приме-

нению данного препарата в качестве селенсодержащей добавки при приготовлении кисломолочных продуктов и пива. В составе обширного микробиоценоза желудочно-кишечного тракта вполне вероятно присутствие микроорганизмов, способных метаболизировать этот препарат. Однако количество работ, посвященных исследованиям взаимодействия ДАФС-25 с микроорганизмами, крайне мало несмотря на то, что такое взаимодействие может иметь негативные последствия, поскольку его продукты могут обладать самыми неожиданными свойствами [4]. В статьях [8—10] описано образование из данного препарата элементарного аморфного селена под влиянием растущего мицелия высших грибов и в их культурах.

Целью данной работы было исследование взаимодействия препарата ДАФС-25 с дрожжевыми культурами *Saccharomyces cerevisiae* и идентификация структур, возникающих в присутствии данных микроорганизмов.

Древко Ярослав Борисович, Ситникова Татьяна Сергеевна, Буров Андрей Михайлович, Древко Борис Иванович, Щеголев Сергей Юрьевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ/МС — газовая хроматография/масс-спектрометрия; ДАФС-25 — диацетофенонилселенид; КЖ — культуральная жидкость; EELS (electron energy losses spectroscopy) — спектроскопия электронных потерь.

* Автор для переписки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали коммерческий препарат пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и ветеринарный препарат ДАФС-25 (ООО «Сульфат», Россия), представляющий собой белый порошок с содержанием селеноорганического соединения диацетофенонилселенида не менее 98%. Содержание селена в препарате составляло 24,9 %, основные примеси были следующие: вода, сульфат и хлорид натрия и не более 0,2 % смеси органических соединений, состоящей из 15—16 компонентов.

К 100 мл среды для культур клеток и тканей RPMI-1640 («БиолоТ», Россия) при интенсивном перемешивании добавляли 1 мл спиртового раствора ДАФС-25 в концентрации 16 мг/мл и 5 г пекарских дрожжей.

Наряду с RPMI-1640 аналогичным образом использовали среды, содержащие в тех же количествах молоко «Волжские просторы», виноградный сок марки «Я» или 2,5%-ный раствор глюкозы. В качестве контрольного эксперимента в 100 мл среды RPMI-1640 добавляли 1 мл раствора селенистой кислоты в концентрации 6,27 мг/мл.

Через 30 мин проводили экстракцию пробы бензолом; для этого к 5 мл экспериментального раствора добавляли 5 мл бензола (Merck, Германия), затем бензольные вытяжки высушивали над безводным сульфатом натрия (Merck) в течение 2 ч.

Полученные экстракты анализировали с помощью ГХ/МС на приборе HP5890/5972 (Hewlett-Packard, США) при следующих условиях: температура инжектора хроматографа — 200°; время действия начальной температуры термостата колонки — 3 мин; начальная температура термостата колонки — 50°; конечная температура термостата колонки, при которой проводится анализ, — 280°; скорость повышения температуры термостата после удаления легкокипящих компонентов — 10°/мин; газ-носитель — гелий, скорость подачи $v = 1$ мл/мин, — а также путем ВЭЖХ на приборе Стайер Аквилон с УФ-детектором UV-104 (Россия) (колонка Луна С-18; элюент 0,1 н. раствор H_2SO_4 —ацетонитрил (3: 2); скорость потока 1,2 мл/мин; объем пробы 20 мкл; длина волны света 254 нм).

Для определения концентрации препарата ДАФС-25 методом ВЭЖХ предварительно строили градуировочный график по стандартным растворам, содержащим 50 мкг/мл, 100 и 200 мкг/мл препарата.

Бензольные экстракты исследовали с помощью просвечивающего электронного микроско-

па Zeiss Libra 120 (Германия) на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов). Качественный анализ на содержание селена в исследуемых образцах был проведен с использованием метода EELS (спектроскопия электронных потерь) [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В присутствии культуры *S. cerevisiae* препарат ДАФС-25 восстанавливался до ацетофенона и селена. Это подтверждается тем, что во всех экспериментах с селеносодержащим препаратом методом ГХ/МС было установлено образование ацетофенона, чего не происходило в контрольных экспериментах без селеносодержащей добавки.

Полученные методом ГХ/МС хроматограммы реакционных смесей показали наличие в них значительного числа продуктов. Образование ацетофенона было выявлено с помощью программы “Extract Ion Chromatograms” (из стандартного пакета программ, прилагаемого к хроматографу) по характерным сигналам с $m/z = 105$ и 120 и подтверждено при применении ацетофенона в качестве стандарта (рис. 1—4). Следует отметить, что масс-спектр стандартного образца ацетофенона и масс-спектр, полученный при анализе КЖ после роста

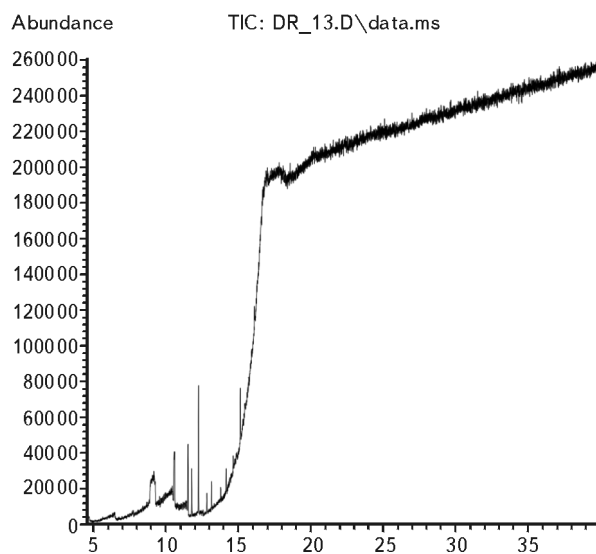


Рис. 1. ГХ/МС-хроматограмма бензольного экстракта из КЖ *S. cerevisiae* после 30 мин культивирования на среде RPMI-1640 с ДАФС-25

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДИАЦЕТОФЕНОНИЛСЕЛЕНИДА (препарат ДАФС-25) ДО АЦЕТОФЕНОНА

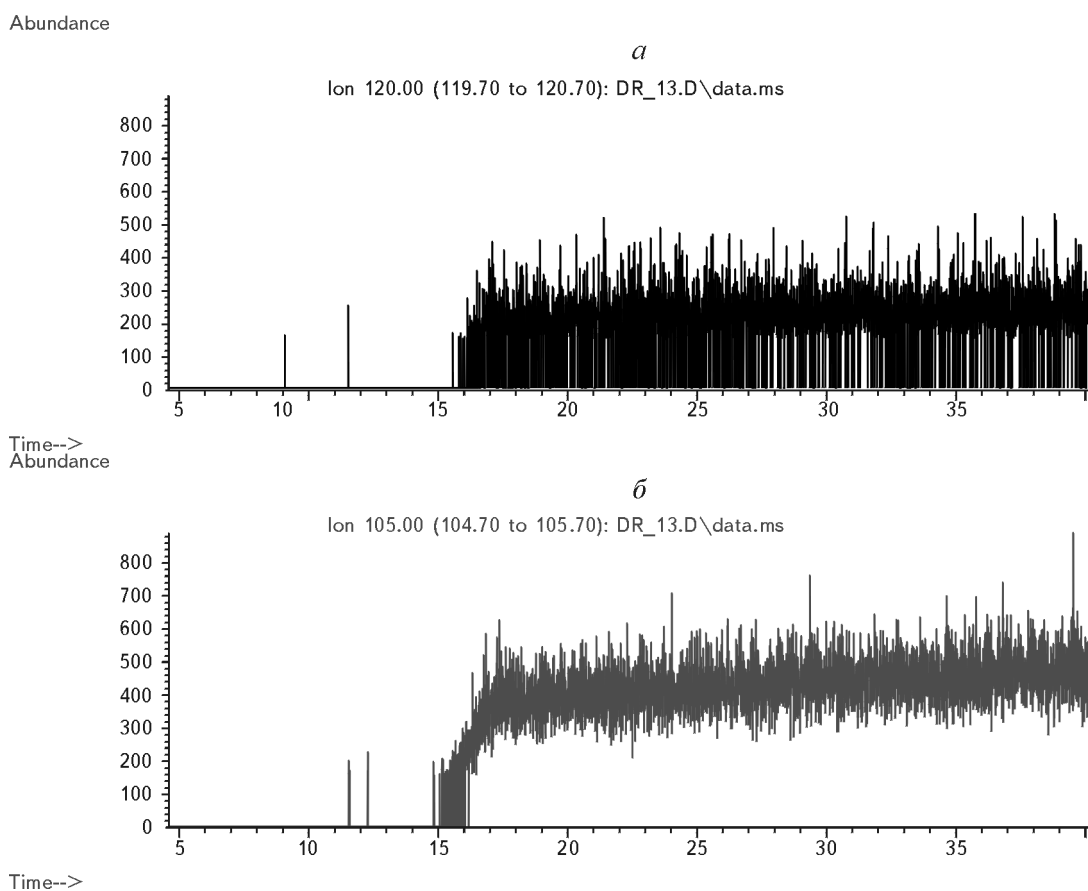


Рис. 2. ГХ/МС-хроматограммы на основе молекулярных ионов с $m/z = 105$ (а) и 120 (б) бензольных экстрактов КЖ *S. cerevisiae* после 30 мин культивирования на среде RPMI-1640 с ДАФС-25

культуры *S. cerevisiae* на среде без ДАФС-25 (см. рис. 3 и 4), были практически идентичны.

Известно, что при анализе бензольных растворов препарата ДАФС-25 на хроматограмме кро-

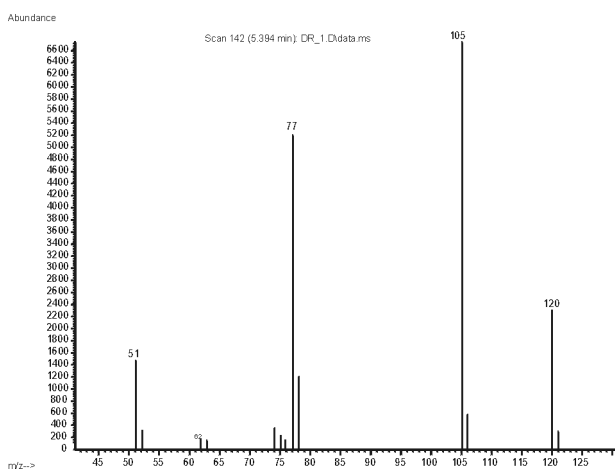


Рис. 3. Масс-спектр ацетофенона (Fluka, Германия)

ме сигнала основного соединения (относительно слабого) имеются также сигналы 1,4-дифенилбутен-2-диона-1,4 и 1,4-дифенилбутандиона-1,4, продуктов разложения ДАФС с элиминированием селена (высококипящие компоненты часто разлагаются на инжекторе хроматографа) [12]. При наличии в среде восстановителей на инжекторе хроматографа образуется и ацетофенон, однако основными продуктами по-прежнему являются соответствующие 1,4-дикетоны. В наших экспериментах сигналы препарата ДАФС-25 и продуктов его деструкции на инжекторе хроматографа в реакционной смеси обнаружены не были, что было подтверждено при применении программы “Extract Ion Chromatograms”. Данные результаты анализа были аналогичны для всех исследованных реакционных сред (см. раздел «Условия эксперимента»).

Кроме того, в конечной реакционной смеси, по данным ВЭЖХ, исходный препарат не был обнаружен (рис. 5). Это показывает отсутствие процесса прямого элиминирования селена из молекулы диацетофенонилселенида.

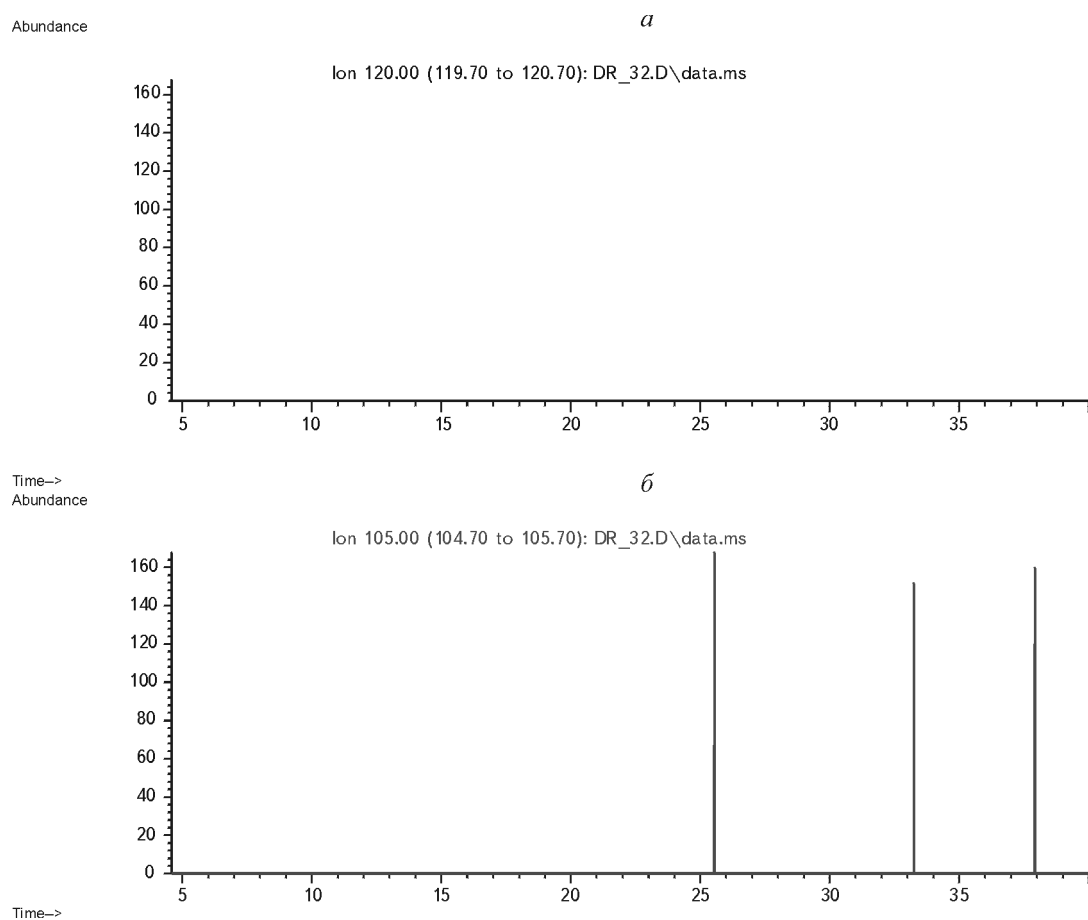


Рис. 4. ГХ/МС-хроматограмма на основе молекулярных ионов с m/z 120 (а) и 105 (б) бензольных экстрактов из КЖ *S. cerevisiae*, полученной при культивировании на среде RPMI-1640 в течение 30 мин без добавления ДАФС-25

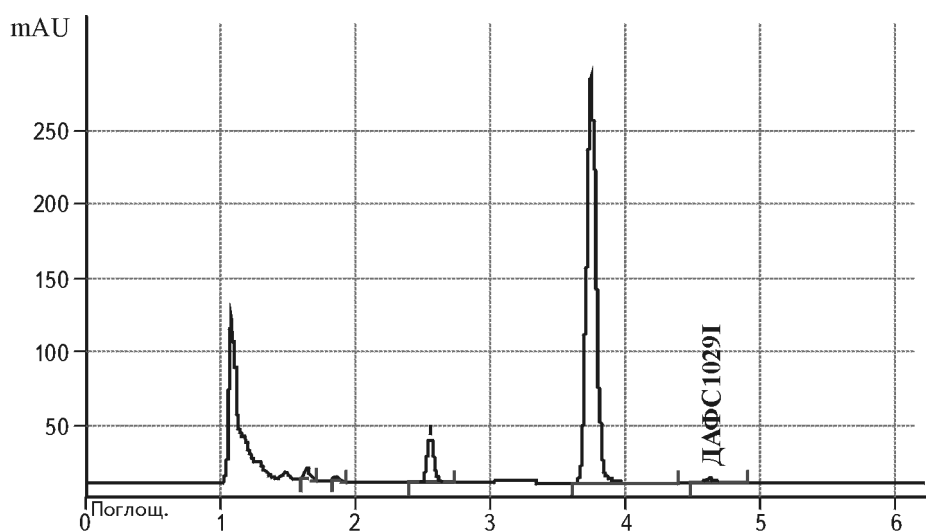


Рис. 5. ВЭЖХ-анализ КЖ *S. cerevisiae* после 30 мин культивирования на среде RPMI-1640 с ДАФС-25

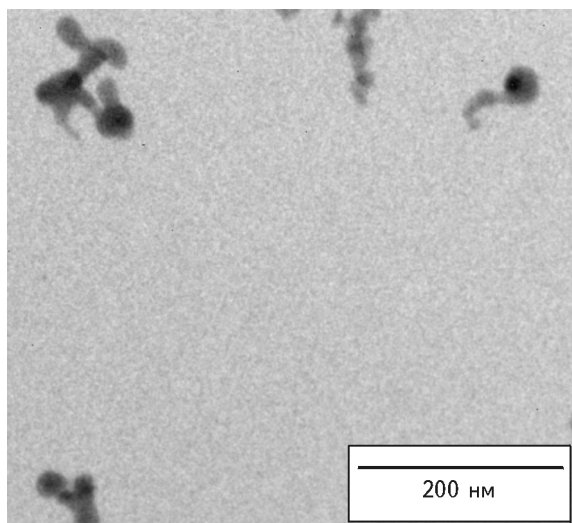


Рис. 6. Образование наночастиц селена после 30 мин культивирования *S. cerevisiae* на среде RPMI-1640 с ДАФС-25

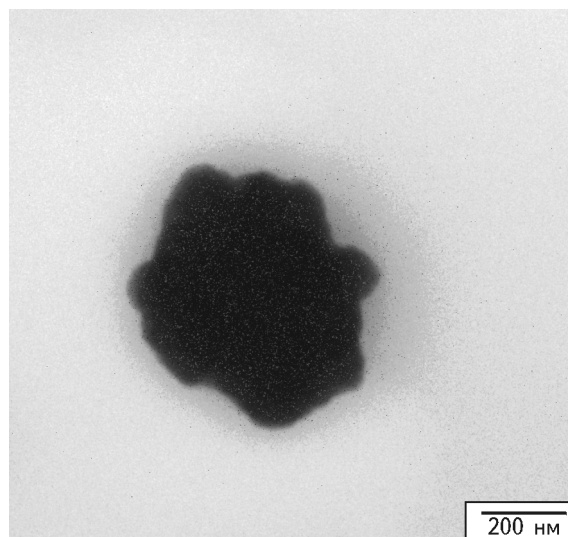


Рис. 7. Образование микрочастиц селена после 30 мин культивирования *S. cerevisiae* на среде RPMI-1640 с ДАФС-25

Методом ВЭЖХ с УФ-детектором установлено, что через 30 мин культивирования дрожжей на среде RPMI-1640 концентрация ДАФС-25 снизилась до 13%. Результаты анализа были аналогичны для всех исследованных реакционных сред. Так, в опытах с заменой RPMI-1640 на молоко 3,2 %-ной жирности через 30 мин после начала эк-

сперимента зафиксирован расход 85% исходного вещества.

При помощи просвечивающего электронного микроскопа Zeiss Libra 120 установлено образование шарообразных нано- (рис. 6) и микро- (рис. 7) частиц селена размером 50—400 нм. Результаты анализа были идентичны для всех исследованных

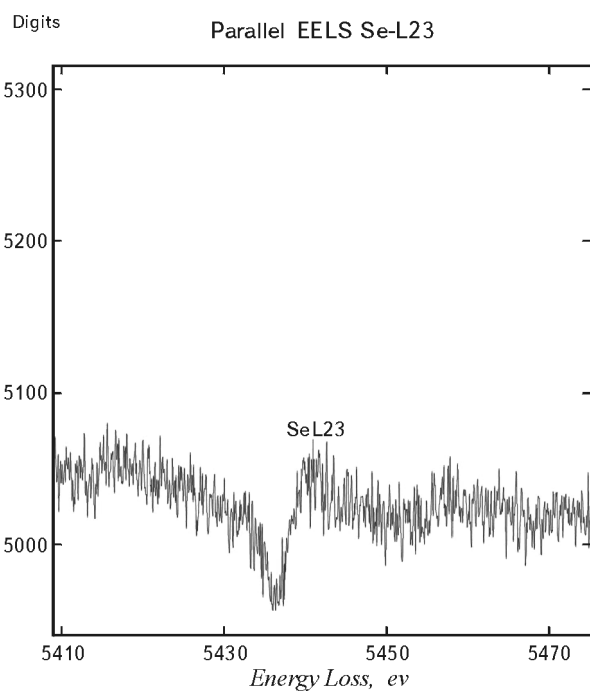


Рис. 8. EELS-спектр микрочастиц селена из КЖ *S. cerevisiae* после 30 мин культивирования на среде RPMI-1640 с ДАФС-25

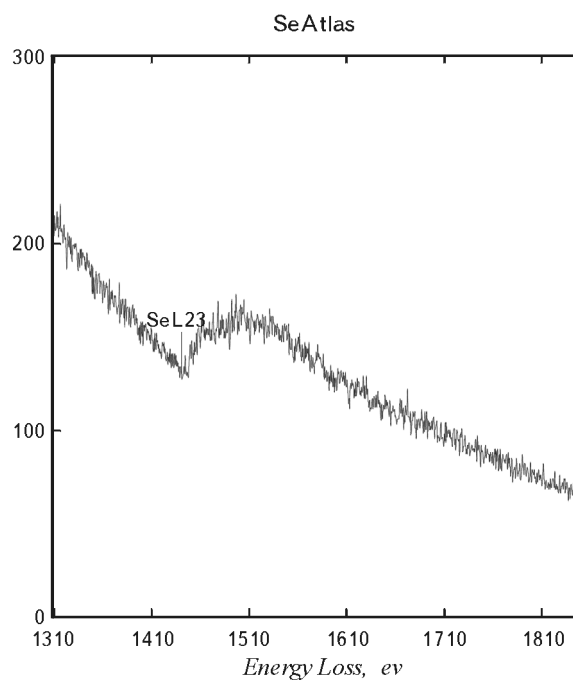


Рис. 9. EELS-спектр (теоретический) селена из программного модуля iTEM EELS (Libra 120 Carl Zeiss)

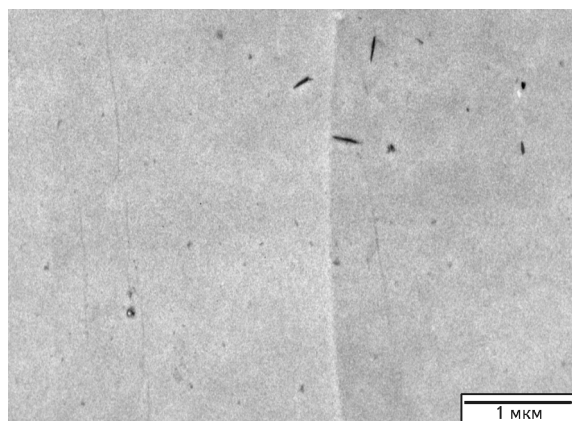


Рис. 10. Образование микрочастиц селена из селенита натрия в питательной среде молока в отсутствие культуры *S. cerevisiae*

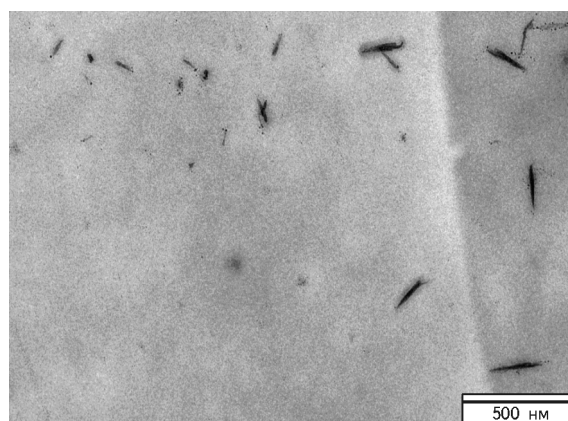


Рис. 11. Образование микрочастиц частиц селена из селенита натрия в питательной среде RPMI-1640 в отсутствие культуры *S. cerevisiae*

реакционных сред. Качественный анализ на содержание селена в исследуемых образцах был проведен с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии EELS [11]. Спектр исследуемого образца селена с переходом L23 (рис. 8) соответствовал теоретическому (взяты из программного модуля iTEM EELS (Libra 120 Carl Zeiss)) (рис. 9), что подтверждается характерным профилем спектральной кривой для селена в области 1400—1450 эВ (с учетом различий между чистым препаратом и соединением в КЖ). Так, показано, что в присутствии культуры *S. cerevisiae* из препарата ДАФС-25 образуются ацетофенон и частицы элементарного селена, в составе которых могут содержаться определенные примеси. Заметим также, что органические примеси, которые в незначительных количествах присутствуют в ДАФС-25 (см. раздел «Условия эксперимента»), не могут оказать существенного влияния на протекающие процессы.

В качестве контрольного эксперимента были проведены аналогичные опыты с селенитом натрия в средах RPMI-1640 и молока без добавления культуры дрожжей. Методом ГХ/МС было показано отсутствие в них ацетофенона, а при исследовании бензольных вытяжек на просвечивающем электронном микроскопе Zeiss Libra 120 установлено образование игольчатых кристаллов селена длиной около 500 нм (рис. 10, 11).

Таким образом, нами впервые установлено, что под воздействием культуры *Saccharomyces cerevisiae* диацетофенилселенид в различных средах восстанавливается до ацетофенона и нано- и микрочастиц селена размером 50—400 нм.

Получено 24.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Древо Б.И., Антипов В.А., Жуков О.И., Фоменко Л.А., Макарова Л.И., Древо Р.И., Радионова Т.Н., Ефремов В.И., Харченко В.Г. Средство для лечения и профилактики болезней, вызываемых недостаточностью селена в организме сельскохозяйственных животных и птиц // Патент РФ 2051681, А 61 К 33/04. 1996.
2. Древо Б.И., Древо Р.И., Антипов В.А., Чернуха Б.А., Яковлев А.Н. Средство для лечения и профилактики инфекционных заболеваний и отравлений животных и птиц, повышающее их продуктивность и сохранность // Патент РФ 2171110, А 61 К 33/04. 2001.
3. Боряев Г.И., Блинохватов А.А., Вихрева В.А. Способ получения биологически активного вещества — селенопирана, селенопиран и продукты его содержащие // Патент РФ 2281007, А23/16 (29,30,305), А6131/095. 2004.
4. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. 58. Селен. — Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1989. — 270 с.
5. Ермаков В.В., Ковальский В.В. Биологическое значение селена. — М.: Наука, 1974. — 298 с.
6. Chaudhary, S. Surface functionalized selenium nanoparticles for biomedical applications/ S. Chaudhary, U. Ahmad, S. K. Mehta // J. Biomed. Nanotechnol. — 2014. — V. 10. — P. 3004—3042.
7. Bangjun, Z. Protective effects of selenium nanoparticles on oxidative stress and antioxidant enzymes activities induced by microcystins in the liver of mice/ Z. Bangjun, L. Xiaoyu // Shuisheng Shengwu Xuebao. — 2010. — V. 34. — N 3. — P. 679—683.
8. Полубояринов П.А. Образование элементарного селена при распаде молекулы селеноорганического препарата ДАФС-25 под влиянием растущего мицелия грибов / П.А. Полубояринов, В.А. Вихрева, П.П. Лешченко, А.В. Ариповский, А.Н. Лихачев // Вестник Моск. ун-та. Биология. — 2009. — № 4. — С.33—37.

9. *Tsvileva, O.M.* Biodegradation of an Organoselenium Compound to Elemental Selenium by *Lentinula edodes* (Shiitake) Mushroom / O.M. Tsvileva, E.A. Loshchinina, A.N. Pankratov, M.M. Burashnikova, N.A. Yurasov, N.N. Bylinkina, I.A. Kazarinov, V.E. Nikitina // Biol. Trace Element Res. — 2012. — V. 149. — N 1. — P. 97—101.
10. *Панкратов А.Н.* Ростовые и метаболические эффекты ксенобиотической органической формы селена в культуре базидиомицета *Lentinula edodes* / А.Н. Панкратов, Е.А. Лощинина, О.М. Цивилева, М.М. Бурашникова, И.А. Казаринов, Н.Н. Былинкина, В.Е. Никитина // Изв. Саратовского ун-та. Новая серия: Химия. Биология. Экология. — 2012. — Т. 12. — №. 1. — С. 11—16.
11. *Шебанова А.С.* Применение методов аналитической просвечивающей электронной микроскопии для детекции, идентификации и выявления локализации наночастиц оксидов титана и церия в клетках млекопитающих / А.С. Шебанова, А.Г. Богданов, Т.Т. Исмагулова, А.В. Феофанов, П.И. Семенов, В.И. Муронец, М.В. Ерохина, Г.Е. Онищенко, М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан // Биофизика. — 2014. — Т. 59. — №. 2. — С. 348—349.
12. *Древко Б.И., Плотников С.В., Мандыч В.Г., Никурашина М.Л.* Исследование реакций 1,5-дифенил-3-селенапентандиона-1,5 в водных растворах галогеноводородов: Карбонильные соединения в синтезе гетероциклов. — Саратов: Научная книга, 2008. — С. 210—212.

Ya.B. DREVKO^{1,*}, T.S. SITNIKOVA¹, A.M. BUROV²,
B.I. DREVKO¹, and S.Yu. SHCHEGOLEV²

¹The Vavilov Saratov State Agrarian University, 410012, Saratov Russia

²The Institute for Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russ. Acad. Sci., 410049, Saratov Russia

e-mail: drevko@list.ru

Reduction of Diacetophenonyl Selenide (DAPS-25 Preparation) up to Acetophenone with the Formation of Selenium Micro- and Nanoparticles in the Occurrence of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture

It has been found out that in the presence of a culture of *Saccharomyces cerevisiae*, the DAPS-25 formulation underwent a reduction with acetophenone and elemental selenium yielding, the latter occurring as spherical nano- and microparticles with sizes ranging from 50 to 400 nm. Under the same conditions, sodium selenite was reduced to give rise to needlelike selenium particles up to 500 nm in size. The rate of conversion for the formulation obtained using the yeast culture liquid was shown not to depend on the composition of the nutrient medium used.

Key words: DAPS-25 (diacetophenonyl selenide), reduction, *Saccharomyces cerevisiae*, selenium nanoparticles.

* Author for correspondence.