

І.В. Сіора, О.С. Куколевська, Т.В. Крупська, І.І. Геращенко

ВПЛИВ НАНОКОМПОЗИТІВ З ПРОЛОНГОВАНИМ ВИВІЛЬНЕННЯМ БІОАКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, 03164, Київ, 03164, Україна, E-mail: siora@ukr.net

За результатами вивчення кінетики виділення вуглекислого газу в процесі спиртового бродіння встановлено стимулюючий вплив цинковмісних наноматеріалів на культуру дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Методом прижиттєвого фарбування трипановим синім показано, що серед полімерних матриць без наповнювача (поліуретан, взаємопроникні сітки поліуретан/полі(2-гідроксіетилметакрилат)) плівка з поліуретану найменше пошкоджує дріжджові клітини. Натомість наноккомпозити, які містять кремнезем, модифікований нітратом срібла, знижують життєздатність дріжджів зі збільшенням вмісту поліуретану в складі матриці. Ця закономірність корелює зі швидкістю вивільнення з наноккомпозитів іонів срібла у водне середовище.

Ключові слова: нанокремнезем, поліуретан, полі(2-гідроксіетилметакрилат), нітрат срібла, сульфат цинку, гліцин, триптофан, дріжджі, трипановий синій, біоактивність

ВСТУП

У зв'язку з широким розповсюдженням нанотехнологій та впровадженням наноматеріалів у медичну практику постає питання первинної оцінки їхньої біоактивності в умовах хімічної лабораторії, тобто там, де ці матеріали були синтезовані. Одним із доступних випробувань є встановлення мембранотропної активності матеріалів (високодисперсних порошків, наноккомпозитів, плівок, гранул тощо) при прямому контакті з клітинами. Об'єктом для проведення таких досліджень виступають ізольовані клітини, зокрема еритроцити. Так, мембранотропну активність високодисперсних оксидів оцінюють за ступенем вивільнення гемоглобіну після пошкодження мембран (гемоліз-тест) або за зміною форми еритроцитів [1–3]. Первинне визначення біоактивності нанодисперсних матеріалів й інших об'єктів може також полягати у вивченні їхнього впливу на одноклітинні мікроорганізми – дріжджі. «Дріжджовий тест», в якому реєструють газовиділення в процесі спиртового бродіння [4], був застосований для вивчення біостимулюючої активності препаратів плаценти [5] та для тестування композитів нанокремнезему з левоміцетином [6]. Відомі

методи, де життєздатність клітин оцінюють шляхом фарбування різними барвниками [7].

Метою роботи було встановити вплив пліткових наноккомпозитів з пролонгованим вивільненням у водне середовище біологічно активних речовин (амінокислот, сполук цинку та срібла) на життєдіяльність дріжджових клітин.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі досліджували біоактивність (а) плівки з поліуретану (ПУ); (б) взаємопроникної полімерної сітки з поліуретану та полі(2-гідроксіетилметакрилату) (ВПС ПУ/ПГЕМА); (в) порошкоподібних наповнювачів для цих полімерів – ущільненого нанорозмірного кремнезему «Денсилю» (SiO_2) з нанесеними на його поверхню біоактивними речовинами: сульфатом цинку, нітратом срібла, амінокислотами гліцином та триптофаном; (г) пліткових наноккомпозитів, які являють собою наповнену модифікованим нанокремнеземом матрицю з ПУ або ВПС ПУ/ПГЕМА. Наповнювачі одержано механохімічним методом д.х.н. Вороніним Є.П. та к.х.н. Носач Л.В., для чого були використані нанорозмірний кремнезем А-300 (дослідний завод ІХП НАН України, м. Калущ), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Росія), AgNO_3 (Україна), гліцин і

триптофан. Полімерні матриці та наноккомпозити синтезовані в Інституті хімії високомолекулярних сполук НАН України під керівництвом д.х.н. Карбанової Л.В., для синтезу ПУ та ВПС ПУ/ПГЕМА застосовані реагенти виробництва Merck, Німеччина.

Для вивчення вивільнення біоактивних сполук було взято по три зразки наноккомпозитних матеріалів з кожної серії, з мінімальним (63 %), середнім (83 %) і максимальним (100 %) вмістом ПУ в складі полімерної матриці (табл. 1).

Таблиця 1. Склад досліджуваних матеріалів

№ зразка	Склад матриці, мас. %		Склад наповнювача	Вміст наповнювача в наноккомпозиті, мас. %
	ПУ	ПГЕМА		
1	63	37	SiO ₂ /8.6 % ZnSO ₄	9.49
2	63	37	SiO ₂ /9 % AgNO ₃	9.49
3	63	37	SiO ₂ /20.3 % триптофану	9.49
4	63	37	SiO ₂ /15.3 % гліцину	9.49
5	83	17	SiO ₂ /8.6 % ZnSO ₄	11.1
6	83	17	SiO ₂ /9 % AgNO ₃	11.1
7	83	17	SiO ₂ /20.3 % триптофану	11.1
8	83	17	SiO ₂ /15.3 % гліцину	11.1
9	100	–	SiO ₂ /8.6 % ZnSO ₄	15.0
10	100	–	SiO ₂ /9 % AgNO ₃	15.0
11	100	–	SiO ₂ /20.3 % триптофану	15.0
12	100	–	SiO ₂ /15.3 % гліцину	15.0
13	63	37	–	–
14	83	17	–	–
15	100	–	–	–

Для визначення концентрації Ag⁺ і Zn²⁺ в пробах водного середовища використовували екстракційно-фотометричний метод, що ґрунтується на реакції даних іонів з дитизоном. Кольорові дитизонати цинку та срібла екстрагували чотирьохлористим вуглецем, після цього визначали оптичну густину екстрактів [8, 9]. Спостереження за вивільненням сполук цинку і срібла проводили протягом 16 діб.

Концентрацію амінокислот визначали фотоколориметричним методом, в якому використовується реакція з нінгідрином. Метод базується на тому, що в лужному середовищі амінокислоти утворюють з нінгідрином сполуку синьо-фіолетового кольору [10].

Як тестові клітини використовували сухі хлібопекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* двох виробників – ЗАТ «Ензим» (Україна) та «Саф-Момент» (Франція). Дріжджовий тест виконували в двох варіантах. У першому – визначали вплив наповнювачів на життєдіяльність дріжджів, показником якої слугувала інтенсивність виділення вуглекислого газу в процесі спиртового

бродиння [4]. Для цього до 1 %-ої суспензії дріжджів (виробництва «Ензим»), які культивували в 10 %-му розчині сахарози при 25 °С, додавали порошкоподібні наповнювачі. Реакційну колбу закривали пробкою з вбудованим у неї затвором. У процесі бродиння в колбі утворювався СО₂, який вільно виділявся, в результаті чого маса реакційного посуду зменшувалася. Кінетику виділення вуглекислого газу реєстрували шляхом періодичного зважування реакційної колби з точністю до 0.001 г. Достовірність отриманих результатів забезпечували повторенням вимірювань та статистичним обчисленням середнього значення [5, 6]. Для приблизного визначення кількостей речовин-стимуляторів, які необхідно додавати до реакційного середовища, використовували дані літератури. Так, у роботі [11] було показано, що вміст іонів цинку в діапазоні від 0.3 до 1.2 мг/л є оптимальним для росту дріжджів *S. zeylanoides* і *S. brumptii*, а в статті [12] наведено вміст деяких амінокислот у біомасі дріжджів: аланіну – 0.513 мг/г, глутамінової

кислоти – 0.373 мг/г. Отже, в реакційну колбу вносили такі кількості порошоків, щоб створити відповідний наведеним значенням вміст іонів цинку та гліцину.

У другому варіанті дріжджового тесту для встановлення впливу нанокompозитів на життєздатність дріжджів виробництва «Саф-Момент» виконували типування клітин на живі та мертві шляхом фарбування 0.4 % розчином трипанового синього (Sigma) за стандартною методикою [7]. Для мікроскопічного спостереження використовували мікроскоп «МИКМЕД-2», реєструючи зображення цифровою камерою «VISION CAM V300», закріпленою на окулярі мікроскопа. Суспензію дріжджів із концентрацією $17.2 \cdot 10^6$ клітин/см³ готували на 5 %-му розчині сахарози. Підрахунок клітин здійснювали в камері Горяєва за стандартною методикою [13, 14]. Суспензію залишали на час, достатній для початку фази експоненціального росту кількості клітин. Плівки для набухання занурювали в 5 %-ий розчин сахарози на 18 год, після чого обсушували фільтрувальним папером. На предметне скло клали плівку, на

неї наносили по одній краплині суспензії дріжджів і розчину трипанового синього та накривали покривельним склом. У контрольному досліді клітини і розчин барвника наносили на предметне скло. Мікроскопічні дослідження здійснювали через 0.5, 1.5, 2.5 та 3.5 год. У полі зору живі клітини залишалися світлими, тоді як мертві зафарбовувались барвником. З кожного зразка робили 4–6 мікрофотографій, вибираючи різні ділянки поверхні. Показник життєздатності клітин розраховували за формулою:

$$N_{жс} = \frac{n_{жс} \times 100}{n_{жс} + n_{м}},$$

де $N_{жс}$ – вміст життєздатних клітин, %, $n_{жс}$ – кількість живих клітин, $n_{м}$ – кількість мертвих клітин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення швидкості вивільнення іонів цинку, срібла та амінокислоти гліцину з нанокompозитів представлені на рис. 1.

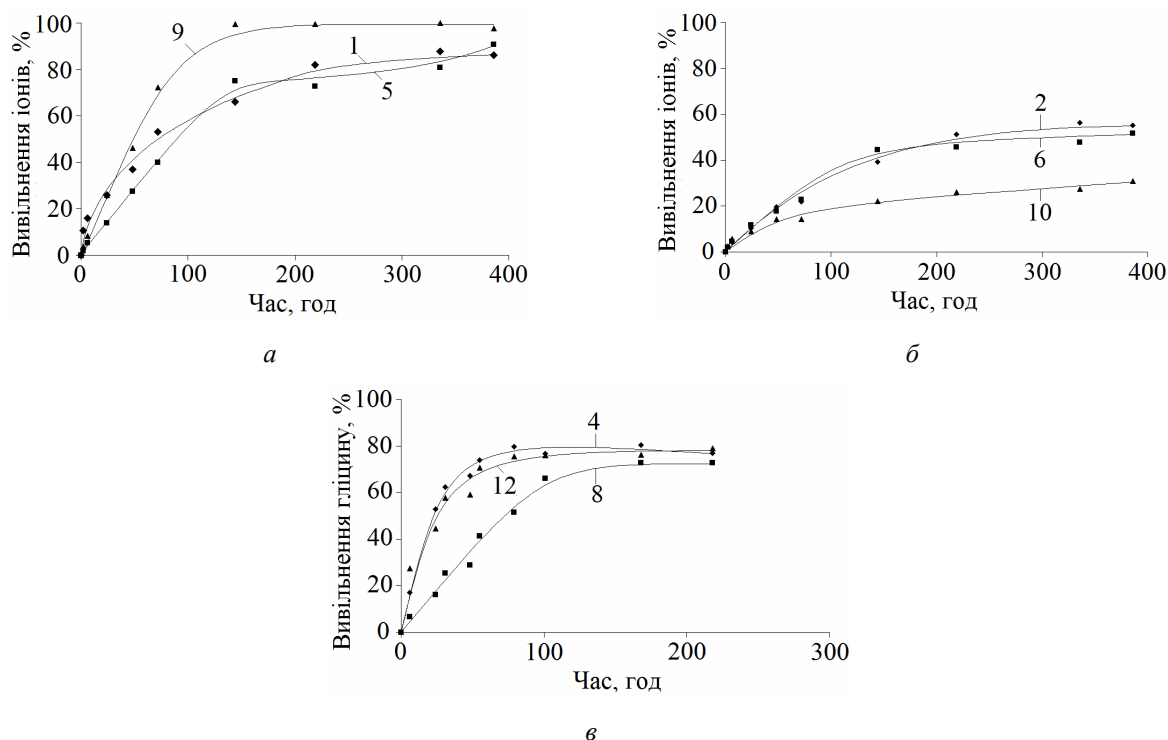


Рис. 1. Кінетичні криві вивільнення іонів цинку (а), срібла (б) і гліцину (в) у водне середовище. Номери нанокompозитів наведені на графіках, склад див. у табл. 1

Як видно з наведених графіків, іони цинку найкраще вивільняються з композиту на основі ПУ з повним виходом на шосту добу спостереження; ВПС (83ПУ/17ПГЕМА і 63ПУ/37ПГЕМА) показали майже однакову кінетику вивільнення Zn^{2+} з виходом близько 90 % на 14 добу.

Для композитів із сріблом, навпаки, найгірше вивільнення Ag^+ спостерігається для зразка на основі ПУ та становить близько 30 % на 14–15 добу; ВПС (63ПУ/37ПГЕМА і 83ПУ/17ПГЕМА) демонструють приблизно однакову кінетику з виходом близько 50 % Ag^+ на 14–16 добу.

Для всіх композитів з гліцином вивільнення сягає максимального значення 72–78 % на сьому добу. Зразок на основі матриці 83ПУ/17ПГЕМА демонструє більш рівномірну і повільнішу на першому етапі кінетику вивільнення цієї амінокислоти порівняно з ПУ і ВПС 63ПУ/37ПГЕМА.

Встановлено, що триптофан зовсім не вивільняється з досліджуваних нанокompозитів. Даний факт можна пояснити такими ймовірними причинами: 1) відбувається деструкція триптофану на етапі включення наповнювача до складу композиту; 2) утворюється міцне (хімічне) з'єднання амінокислоти з полімерною матрицею.

Як відомо, серед біогенних мікроелементів цинк посідає чільне місце, оскільки він входить до складу понад 120 ферментів, що забезпечують нормальне функціонування макро- та мікроорганізмів [15]. Зокрема, іони цинку містяться в найважливіших ферментах спиртового бродіння – алкогольдегідрогеназі та альдолазі й тому істотно впливають на процес утворення етанолу. З огляду на це, показовим є вивчення впливу цинковмісних зразків (індивідуальної солі $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, механічних сумішей і композитів сульфату цинку з кремнеземом, одержаних механохімічним способом) на бродильну енергію дріжджів.

Як видно з рисунку 2, достовірно інтенсивніше газовиділення, порівняно з контрольним дослідом, спостерігається при додаванні до середовища суміші $SiO_2 + ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, індивідуального сульфату цинку та ущільненого кремнезему (в одному з трьох дослідів), що свідчить про їх активуючу дію на дріжджі. Для решти зразків, зокрема

композитів $SiO_2/ZnSO_4$ і SiO_2/ZnO , спостерігається тенденція до посилення газовиділення.

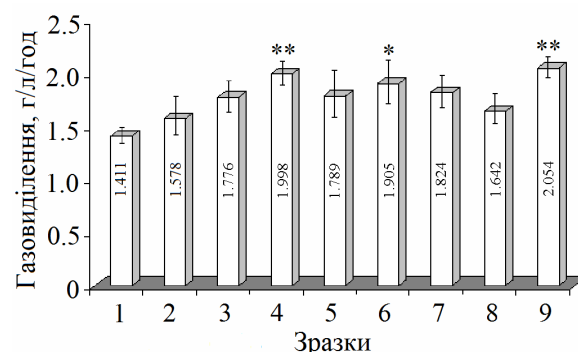


Рис. 2. Вплив цинковмісних матеріалів на виділення CO_2 суспензією дріжджів: контроль (1); нанокompозит $SiO_2/8.6\% ZnSO_4$ (2); нанокompозит $SiO_2/6.1\% ZnO$ (3); суміш $SiO_2 + ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (містить 10.5 % $ZnSO_4$) (4); суміш $SiO_2 + 6.1\% ZnO$ (5); індивідуальна сіль $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (56 % $ZnSO_4$) (6), ущільнений кремнезем (7–9). Достовірно відхилення порівняно з контролем: * – $p < 0.1$; ** – $p < 0.05$. Час спостереження 10 год

Таким чином, цинковмісні наповнювачі, одержані методом механохімії, характеризуються дещо меншим активуючим впливом на процес спиртового бродіння порівняно із сумішшю $SiO_2 + ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. З цього можна зробити висновок про іммобілізацію іонів цинку на поверхні кремнезему під час механохімічної обробки, посередником якої, ймовірно, є молекули води.

Зразки з амінокислотами (індивідуальні субстанції, механічні суміші та композити з кремнеземом) чинять певний стимулюючий вплив на культуру клітин, однак чіткої залежності від способу приготування зразків встановити не вдалось. До цього слід додати, що через віддалені терміни спостереження (34, 56 та 78 год) усі препарати з амінокислотами впливають на газовиділення на рівні контрольного дослідів, тобто не виявляють активуючих властивостей.

Результати вивчення життєздатності дріжджових клітин після контакту з поверхнею плівкових нанокompозитів методом фарбування трипановим синім наведені на рис. 3 і 4. Враховуючи великий обсяг фактичного матеріалу, ми вибірково наводимо лише найтипівіші мікрофотографії.

Підрахунок живих та загиблих клітин виявив, що поліуретанова плівка чинить незначну пошкоджуючу дію на дріжджі, навіть меншу, ніж скло в контрольному досліді. Полімерні матриці ВПС ПУ/ПГЕМА також характеризуються високою біосумісністю. Доволі великі скупчення клітин (рис. 3) свідчать про активний процес їхнього поділу та здатність до самоадгезії.

Результати мікроскопічного вивчення плівок, наповнених кремнеземом, модифікованим нітратом срібла, вибірково представлені на рис. 4. З наведених мікрофотографій видно, що з часом кількість мертвих клітин на поверхні срібловмісних нанокompозитів зростає. Серед клітин чимало слабо розвинених, із зменшеним майже в 2 рази об'ємом; на мікрофотографіях іноді складно розрізнити живі та мертві клітини.



Рис. 3. Дріжджові клітини на поверхні полімерних плівок без наповнювача: зразок 13 (а) і 14 (б). Склад зразків див. у табл. 1. Термін інкубації 1.5 год

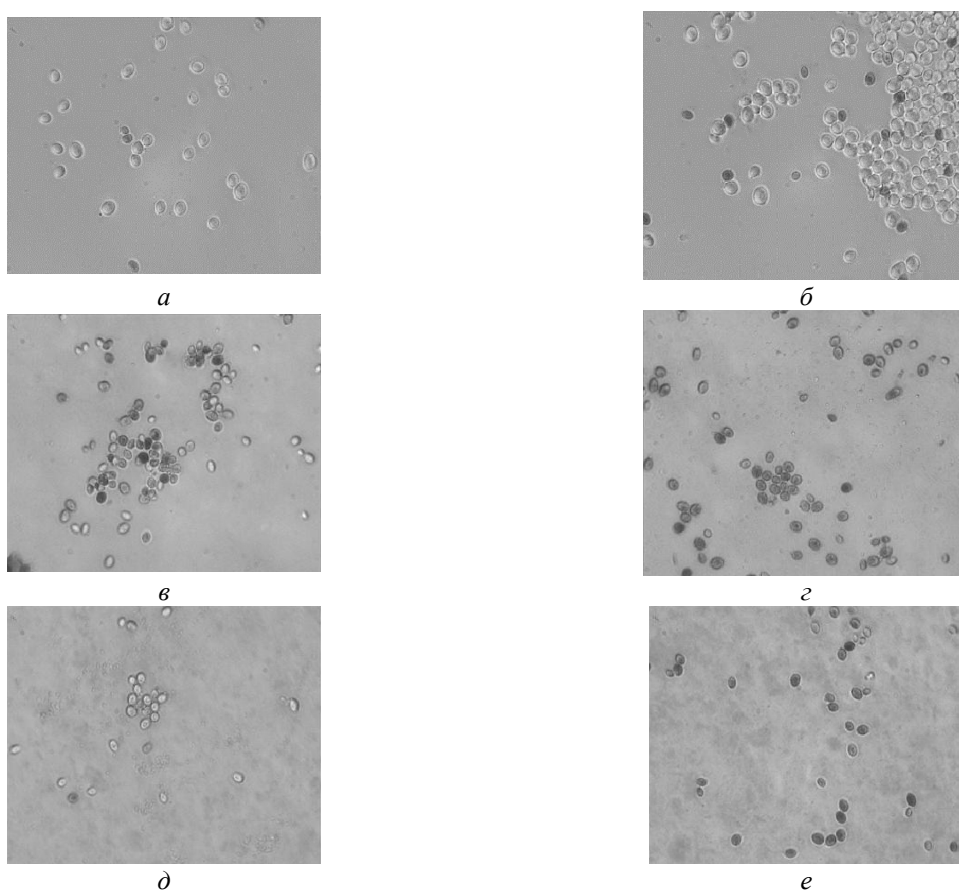


Рис. 4. Дріжджові клітини на поверхні срібловмісних нанокompозитів: контроль (скло) (а, б), зразок № 6 (в, з) і № 10 (д, е). Склад зразків див. у табл. 1. Терміни інкубації 1,5 год (а, в, д) і 3,5 год (б, з, е)

Підсумкові дані, які характеризують життєздатність клітин у залежності від складу нанокompозиту, в динаміці, представлено на

діаграмах, розташованих у порядку зростання вмісту поліуретану в складі матриці: 63 %→83 %→100 % (рис. 5).

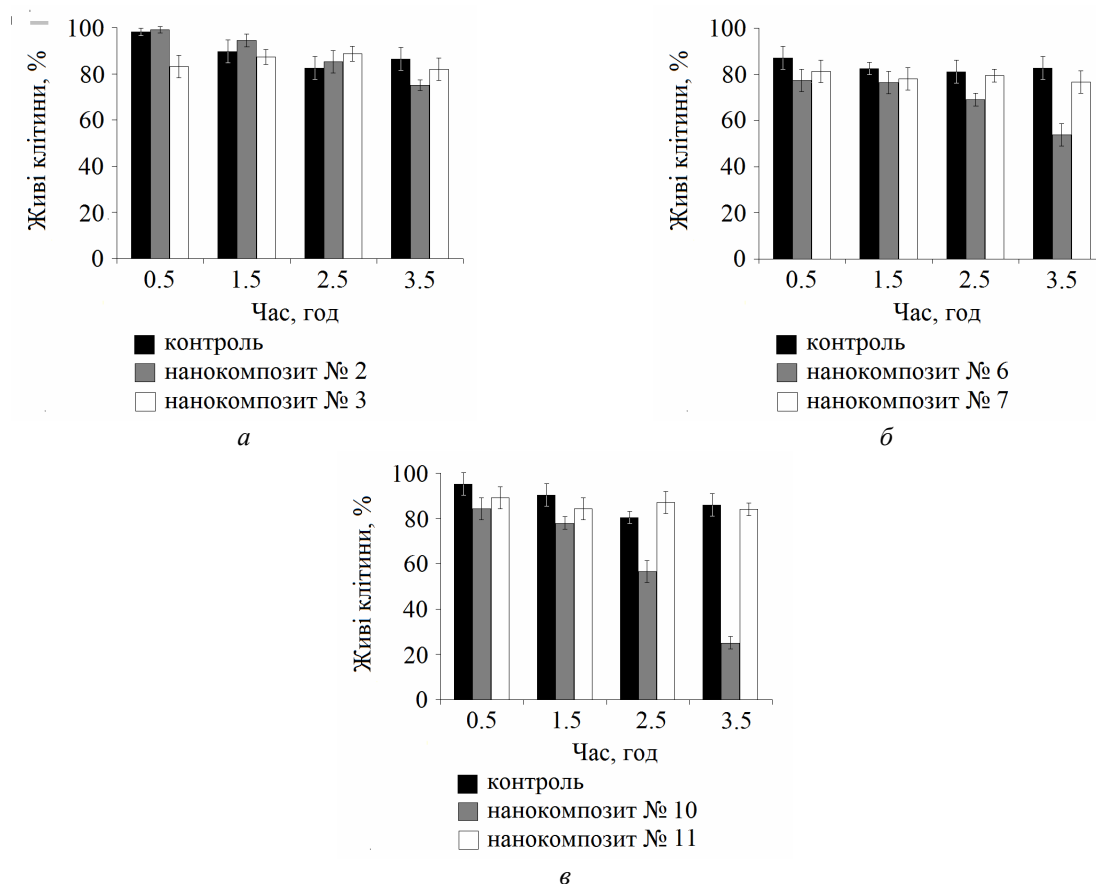


Рис. 5. Мікроскопічна оцінка залежності життєздатності дріжджів на поверхні нанокompозитів від часу інкубації. Склад нанокompозитів див. у табл. 1

З наведених даних видно, що нанокompозити з інкорпорованим триптофаном практично не впливають на життєздатність дріжджових клітин. Це узгоджується з даними про те, що триптофан не вивільняється з плівок у водне середовище.

Нанокompозити, до складу яких уведений кремнезем, модифікований нітратом срібла, характеризуються пошкоджуючою дією на клітини дріжджів, яка посилюється з часом. У ряду композитів на основі матриць 63ПУ/37ПГЕМА, 83ПУ/17ПГЕМА, ПУ спостерігається монотонне збільшення пошкоджуючої дії (незважаючи на те, що ненаповнена поліуретанова плівка є найменш токсичною для дріжджових клітин). Відтак, найбільш негативний вплив на дріжджі чинить композит № 10 – через 3.5 год на його поверхні

залишається лише 25 % життєздатних клітин. Ці результати цілком узгоджуються з відомими антимікробними властивостями нітрату срібла.

При співставленні результатів дріжджового тесту з кінетикою вивільнення нітрату срібла у водне середовище встановлено, що композит № 10, який найбільше пригнічує ріст дріжджових клітин, характеризується повільнішою, порівняно з композитами № 2 і № 6, швидкістю вивільнення іонів срібла в часовому інтервалі 0–16 діб (рис. 1 б). Пояснення цьому, нібито парадоксальному, факту можна знайти, якщо дослідити швидкість вивільнення іонів срібла на початковому часовому відрізку, 0–6 год (табл. 2).

Як видно, протягом перших 6 год нанокompозит № 10 суттєво випереджає за вивільненням срібла зразки № 2 і № 6, а після

24 год починає відставати. Таким чином, нанокompозит на основі ПУ призначений для швидкої дії, а на основі ВПС ПУ/ПГЕМА – для

тривалої дії, що слід враховувати під час розробки медичних засобів.

Таблиця 2. Кореляція між біоактивністю і початковою швидкістю вивільнення іонів срібла для нанокompозитів з різним вмістом ПУ

№ зразка	Склад матриці	Вивільнення Ag^+ , %, через		Вміст живих клітин, %, через	
		2 год	6 год	2.5 год	3.5 год
2	63ПУ/37ПГЕМА	2.04	4.37	85.3	75.2
6	83ПУ/17ПГЕМА	2.14	4.59	69.1	53.8
10	ПУ	2.60	5.78	56.6	25.0

ВИСНОВКИ

Нанокompозитний матеріал, матрицею якого слугує взаємопроникна полімерна сітка ПУ/ПГЕМА, а наповнювачем – кремнезем, модифікований сполуками цинку, срібла або гліцином, демонструє пролонговану кінетику вивільнення цих речовин у водне середовище. З нанокompозитів, що містять триптофан, амінокислота не вивільняється.

Цинковмісні наповнювачі нанокompозитів, одержані методом механохімії, виявляють стимулюючий вплив на культуру дріжджів; натомість срібловмісні нанокompозитні матеріали пригнічують життєдіяльність дріжджових клітин, нанесених на їхню поверхню. Дані

дріжджового тесту корелюють з результатами вивчення кінетики вивільнення іонів цинку і срібла у водне середовище.

Досліджені нанокompозити, враховуючи результати оцінки біоактивності з використанням дріжджових клітин та пролонгований характер вивільнення з них інкорпорованих сполук, можна вважати перспективними матеріалами для виготовлення медичних виробів – імплантатів, катетерів, дренажів тощо.

Робота виконана в рамках проекту № 6.22.7.21 ДЦНТП «Нанотехнології та наноматеріали».

Влияние нанокompозитов с пролонгированным высвобождением биологически активных веществ на жизнедеятельность дрожжевых клеток

И.В. Сиора, Е.С. Куколевская, Т.В. Крупская, И.И. Герашенко

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, 03164, Киев, Украина, siora@ukr.net*

*В результате изучения кинетики выделения углекислого газа в процессе спиртового брожения установлено стимулирующее влияние цинксодержащих наноматериалов на культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Методом прижизненного окрашивания трипановым синим показано, что среди полимерных матриц без наполнителя (полиуретан, взаимопроникающие сетки полиуретан/поли(2-гидроксиэтилметакрилат)) пленка из полиуретана наименее повреждает дрожжевые клетки. Напротив, нанокompозиты, содержащие кремнезем, модифицированный нитратом серебра, снижают жизнеспособность дрожжей с увеличением содержания полиуретана в составе матрицы. Эта закономерность коррелирует со скоростью высвобождения из нанокompозитов ионов серебра в водную среду.*

Ключевые слова: нанокремнезем, полиуретан, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), нитрат серебра, сульфат цинка, глицин, триптофан, дрожжи, трипановый синий, биологическая активность

Impact of nanocomposites with prolonged release of bioactive substances on the vital activity of yeast cells

I.V. Siora, O.S. Kukolevska, T.V. Krupska, I.I. Gerashchenko

Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv 03164, Ukraine, siora@ukr.net

As a result of a study on the kinetics of carbon dioxide formation during alcohol fermentation, the stimulating effect of zinc containing nanomaterials on *Saccharomyces cerevisiae* yeast has been found. By the method of in vivo staining with trypan blue it has been shown that film of polyurethane the least damages yeast cells among the polymer matrices without filler (polyurethane, interpenetrating nets with polyurethane and poly (2-hydroxyethylmethacrylate)). Vice versa, nanocomposites containing silica modified with silver nitrate reduce yeast viability with increasing content of polyurethane in the matrix. This feature correlates with the rate of release of silver ions from nanocomposites to the aqueous medium.

Keywords: nanoparticles of silica, polyurethane, poly(2-hydroxyethylmethacrylate), silver nitrate, zinc sulfate, glycine, tryptophan, yeast, trypan blue, bioactivity

ЛІТЕРАТУРА

1. Геращенко І.І. Мембранотропні властивості нанорозмірного кремнезема // Сб. Поверхність. – 2009. – Вып. 1 (16). – С. 288–306.
2. Сіора І.В. Вплив гідрофобізації та модифікування нанокремнеземів білками та сахаридами на біосумісність композитів на їх основі: автореф. дис. ... канд. хім.наук: 01.04.18 / Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. – Київ, 2014. – 20 с.
3. Gun'ko V.M., Galagan N.P., Grytsenko I.V. et al. Interaction of unmodified and partially silylated nanosilica with red blood cells // Cent. Eur. J. Chem. – 2007. – V. 5, N 4. – P. 951–969.
4. Технологический процесс получения биогенных стимуляторов. – Фрунзе: Киргиз. гос. мед. ин-т, 1983. – 30 с.
5. Крупська Т.В., Володькіна А.В., Геращенко І.І., Гладких Ю.В. Вивчення біостимулювальної активності препаратів плаценти за допомогою дріжджового тесту // Медична хімія. – 2010. – Т. 2, № 2. – С. 40–42.
6. Крупская Т.В., Гунько В.М., Барвинченко В.Н. и др. Взаимодействие кремнезема с клеточной поверхностью дрожжей и состояние межфазной воды в зоне их контакта // Укр. хим. журнал. – 2008. – Т. 74, № 2. – С. 84–91.
7. Coder D.M. Assessment of Cell Viability / Robinson J.P., Darzynkiewicz Z., Hoffman R., Nolan J.P., Rabinovitch P.S., Watkins S., eds. Current Protocols in Cytometry. – New York (NY): Core Publication, John Wiley & Sons, Inc., 1997. – P. 9.2.1–9.2.14.
8. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – Москва: Химия, 1984. – 448 с.
9. Пятницкий И.В., Сухан В.В. Аналитическая химия серебра. – Москва: Наука, 1975. – 264 с.
10. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – Москва: Химия, 1970. – 344 с.
11. Юсупова А.И., Камзолова С.В., Козырева Т.Н., Моргунов И.Г. Биосинтез янтарной кислоты дрожжами из этилового спирта // Вестник биотехнологии. – 2006. – Т. 2, № 4. – С. 7–13.
12. Котенко С.Ц., Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А. Биохимические особенности штамм *Saccharomyces cerevisiae* в условиях спиртового брожения // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1(3). – С. 721–723.
13. Путинцева О.В. Иммунология: практикум. – В 2 ч. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008. – Ч. 2. – 44 с.
14. Аникеев В.В. Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – Москва: Просвещение, 1977. – 146 с.
15. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – Москва: Агар, 1999. – 512 с.

REFERENCES

1. Gerashchenko I.I. Membranotropic properties of nano-sized silica. *Surface*. 2009. **1**(16): 288. [in Russian].
2. Siora I.V. Effect of hydrophobization and modification of nanosilica by proteins and saccharides on

- biocompatibility of the composites on their basis. Ph.D (Chem.) Thesis. (Kyiv, 2014). [in Ukrainian].
3. Gun'ko V.M., Galagan N.P., Grytsenko I.V., Zarko V.I., Oranska O.I., Osaulenko V.L., Bogatyrev V.M., Turov V.V. Interaction of unmodified and partially silylated nanosilica with red blood cells. *Cent. Eur. J. Chem.* 2007. **5**(4): 951.
 4. *Technological process of obtaining of biogenic stimulators*. (Frunze: Kyrgyz State Med. Institute, 1983). [in Russian].
 5. Krupskaya T.V., Volod'kina A.V., Gerashchenko I.I., Gladkikh Yu.V. Study of biostimulatory effect of placenta preparations by yeast growth test. *Med. Chemistry*. 2010. **12**(2): 40. [in Ukrainian].
 6. Krupskaya T.V., Gun'ko V.M., Barvinchenko V.N., Turov V.V., Shulga O.V. Interaction of silica particles with cellular surface and state of interfacial water in area of contact. *Ukr. Chem. J.* 2008. **74**(2): 84. [in Russian].
 7. Johnson S., Nguyen V., Coder D. Assessment of Cell Viability. In: *Current Protocols in Cytometry*. (NY: Core Publ., John Wiley & Sons, Inc., 1997).
 8. Lurie Y.Y. *Analytical chemistry of industrial wastewater*. (Moscow: Khimiya, 1984). [in Russian].
 9. Pyatnitski I.V., Sukhan V.V. *Analytical chemistry of silver*. (Moscow: Nauka, 1975). [in Russian].
 10. Korenman I.M. *Photometric Analysis. Methods for the determination of organic compounds*. (Moscow: Khimiya, 1970). [in Russian].
 11. Yusupova A.I., Kamzolova S.V., Kozyreva T.N., Morgunov I.G. Yeast biosynthesis of succinic acid from ethyl alcohol. *Ovchinnikov Bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2006. **2**(4): 7. [in Russian].
 12. Kotenko S.Ts., Khalilov E.A., Islammagomedova E.A. Biochemical features of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* in conditions of spirit fermentations. *Reports of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2010. **12**(1): 721. [in Russian].
 13. Putintseva O.V. *Immunology: Practicum*. V. 2. (Voronezh: Publishing house of Voronezh State University, 2008). [in Russian].
 14. Anikeev V.V., Lukomskaya K.A. *Guide to practical lessons in microbiology*. (Moscow: Prosveshchenie, 1977). [in Russian].
 15. Philippovich Y.B. *Fundamentals of Biochemistry*. (Moscow: Agar, 1999). [in Russian].

Надійшла 28.01.2015, прийнята 25.09.2015