

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Інститут високих технологій

Кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та
біоінформатики доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 2021 р.

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА БАКАЛАВРА
на тему:**

**ЗЕЛЕНИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТОК ЗАЛІЗА З ВИКОРИСТАННЯМ
ЕКСТРАКТІВ З «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ ПОЛИНУ**

студентки 4 курсу
денної форми навчання
спеціальності 091 «Біологія»
Подгаєцької Юлії Юріївни

Робота виконана у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГ під
керівництвом с.н.с., д.б.н. Матвеевої Надії Анатоліївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2021 р

АНОТАЦІЯ

Випускна кваліфікаційна робота викладена на 54 сторінках, ілюстрована 31 рисунком, 6 таблицями. Список використаних джерел включає 56 робіт.

Новизною роботи є дослідження економічно ефективних, в той же час безпечних і екологічно чистих методів синтезу наночастинок.

У роботі було визначено можливість використання екстрактів з "бородатих" коренів *Artemisia annua* та *Artemisia tilesii* для синтезу наночастинок заліза (FeNPs). Ліофілізовані корені подрібнювали, додавали етанол. Екстракцію здійснювали на шейкері 36 годин. Екстракти центрифугували, супернатант відбирали та використовували для синтезу FeNPs. Для отримання наночастинок заліза до суміші, що складалася з 1 мл розчину $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5,4%), 1 мл $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,9%), 0,1 мл $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2%), додавали 0,5 мл відповідного екстракту. При додаванні до суміші солей екстрактів, отриманих з трансгенних коренів, колір змінювався одразу, що свідчило про початок синтезу FeNPs навіть при $\text{pH}=2$. Утворення наночастинок у цьому варіанті продовжувалося при додаванні аміака ($\text{pH}=9$). Відновлювальна активність екстрактів з "бородатих" коренів була значно вищою, ніж екстрактів з контрольних коренів, що корелює з більшою ефективністю використання перших для синтезу наночастинок заліза. Аналіз FeNPs з використанням трансмісійної мікроскопії показав наявність наночастинок заліза розмірами від 4 нм. Таким чином, екстракти з трансгенних коренів полину є більш ефективними агентами для отримання FeNPs малого розміру.

В заключення, можна сказати, що трансформація привела до змін у вмісті флавоноїдів у трансгенних лініях коренів *Artemisia annua* та *Artemisia tilesii* (вміст флавоноїдів в трансгенних лініях значно вищий ніж у контрольних рослин). Для екстрактів з «бородатих» коренів з високим вмістом флавоноїдів була характерна більша відновлювальна активність.

Ключові слова: «зелений» синтез, «бородаті» корені, флавоноїди, наночастки заліза (FeNPs), відновлювальна активність, електронна трансмісійна мікроскопія, трансгенні лінії.

ANNOTATION

The final qualifying work is set out on 54 pages, illustrated with 31 figures, 6 tables. The list of used sources includes 56 works.

The novelty of the work is the study of cost-effective, at the same time safe and environmentally friendly methods of nanoparticle synthesis.

The possibility of using extracts from "hairy" roots of *Artemisia annua* and *Artemisia tilesii* for the synthesis of iron nanoparticles (FeNPs) was determined. Lyophilized roots were crushed, ethanol was added. The extraction was performed on a shaker for 36 hours. The extracts were centrifuged, the supernatant was collected and used for the synthesis of FeNPs. To obtain iron nanoparticles to a mixture consisting of 1 ml of a solution of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5.4%), 1 ml of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.9%), 0.1 ml of $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2%), was added 0, 5 ml of the corresponding extract. When adding to the mixture of salts of extracts obtained from transgenic roots, the color changed immediately, which indicated the beginning of the synthesis of FeNPs, even at $\text{pH} = 2$. The formation of nanoparticles in this variant continued with the addition of ammonia ($\text{pH} = 9$). The reducing activity of extracts from the "hairy" roots was significantly higher than the extracts from the control roots, which correlates with greater efficiency in the use of the first for the synthesis of iron nanoparticles. Analysis of FeNPs using transmission microscopy showed the presence of iron nanoparticles with sizes from 4 nm. Thus, extracts from transgenic wormwood roots are more effective agents for obtaining FeNPs of small size.

In conclusion, we can say that the transformation led to changes in the content of flavonoids in the transgenic root lines of *Artemisia annua* and *Artemisia tilesii* (the content of flavonoids in the transgenic lines is much higher than in control plants). Extracts from "hairy" roots with a high content of flavonoids were characterized by greater restorative activity.

Key words: "green" synthesis, "hairy" roots, flavonoids, iron nanoparticles (FeNPs), regenerative activity, electron transmission microscopy, transgenic lines.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МРТ – магнітно-резонансна томографія;

ПХБ – поліхлоровані біфеніли;

ПАР – поверхнево-активні речовини;

NPs – (nanoparticles) наночастки;

AuNPs – (Aurum nanoparticles) наночастки золота;

MNPs – (Magnetic nanoparticles) магнітні наночастки;

FeNPs – (Ferum nanoparticles) наночастки заліза.

ЗМІСТ

ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТОК	10
1.1. Методи отримання наночастинок.....	11
1.1.1. Методи хімічного синтезу.....	12
1.1.2. Методи фізичного синтезу	13
1.2. Біологічний метод синтезу наночастинок	14
1.2.1. Синтез за допомогою бактерій	14
1.2.2. Синтез за допомогою грибів	15
1.2.3. «Зелений» синтез: синтез з використанням рослин та рослинних екстрактів	16
1.3. Наночастки заліза та їх використання	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	19
2.1. Рослинний матеріал	19
2.2. Приготування екстрактів.....	19
2.3. Визначення загального вмісту флавоноїдів у екстрактах.....	20
2.4. Визначення відновлювальної активності екстрактів.....	20
2.5. Отримання наночастинок заліза	21
2.5.1. Визначення особливостей синтезування наночастинок заліза з використанням різних солей заліза	21
2.5.2. Синтезування наночастинок з використанням «бородатих» коренів.....	22
2.6. Аналіз наночастинок з використанням електронної трансмісійної мікроскопії	23
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24

3.1. Отримання екстрактів.....	24
3.2.1. Визначення загального вмісту флавоноїдів в зразках на основі екстрактів з <i>Artemisia annua</i>	24
3.2.2. Визначення загального вмісту флавоноїдів в зразках на основі екстрактів з <i>Artemisia tilesii</i>	25
3.3.2. Визначення відновлювальної активності <i>Artemisia tilesii</i>	27
3.4. Визначення впливу складу реакційної суміші на формування наночастинок заліза	28
3.6.1. Аналіз наночастинок синтезованих з використанням екстрактів на основі <i>Artemisia annua</i> з використанням трансмісійної мікроскопії	34
3.6.2. Аналіз наночастинок синтезованих з використанням екстрактів на основі <i>Artemisia tilesii</i> з використанням трансмісійної мікроскопії	37
3.7. Можливість використання FeNPs у сільському господарстві, в якість інгібіторів або стимуляторів росту.....	43
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50

ВСТУП

Широке практичне застосування наночасток металів (НЧ, часток розміром менше 100 нм) обумовлене цілим рядом їх унікальних властивостей [1-4]. На даний момент для синтезу наночасток металів використовують різні фізичні і хімічні методи, що дозволяють отримувати наночастки з потрібними для подальшого використання властивостями [5-8]. Однак, незважаючи на їх широке застосування, це, як правило, високовартісні, трудозатратні способи, пов'язані з ризиком для людини і потенційною небезпекою для навколишнього середовища і живих організмів [9, 10]. Таким чином, існує очевидна потреба в альтернативних економічно ефективніших, дешевших і в той же час безпечних і екологічно чистих методах синтезу наночасток [11-13]. Протягом останнього десятиліття доведено, що багато біологічних систем, включаючи рослини та водорості [14-16], бактерії [17], дріжджі [18], гриби [19] і клітини людини [20], можуть перетворювати іони металів у наночастки за рахунок процесу відновлення, здійснюваного білками і метаболітами, які містяться в цих організмах.

В даній роботі показано, що синтез наночасток з використанням рослин та рослинних екстрактів не тільки можливий, а й має ряд переваг. Показано, що низька вартість вирощування матеріалу, короткі терміни виробництва, екологічність та безпечність і можливість регуляції необхідного обсягу продукції. Все це робить рослини хорошою платформою для синтезу наночасток [21].

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТОК

Протягом останнього десятиліття вчені розробили методи для синтезу та характеристики багатьох нових матеріалів, у тому числі наночасток і нанорозмірних матеріалів з контрольованими властивостями. Отримання наночасток є важливим завданням у нанонауках та нанотехнологіях.

Наночастка — це невеликий дрібнодисперсний об'єкт, що поводить себе як одне ціле щодо своїх транспортних, фізичних та хімічних властивостей. На даний момент розробки методів отримання наночасток металів набуває популярності в усьому світі.

Розміри наночасток складають нанометри, вони існують у природному середовищі, а також створюються в результаті діяльності людини. Завдяки своєму субмікроскопічному розміру вони мають унікальні характеристики, а синтезовані наночастки можуть знайти практичне застосування в різних областях, включаючи медицину, техніку, каталіз та відновлення навколишнього середовища [22].

Останнім часом найчастіше використовують наночасток таких металів, як:

- Срібло. Наночастки срібла використовуються через їх здатність інгібувати ріст бактерій, вірусів тощо [24]. Вони можуть бути застосовані як антимікробні засоби в текстильній промисловості, для очищення води, сонцезахисних лосьйонів тощо [25-26].
- Золото. Наночастки золота (AuNPs) використовуються в імунохімічних дослідженнях для виявлення взаємодії білків. Вони застосовуються як лабораторний відслідковувач ДНК-відбитків для виявлення присутності ДНК. Вони також використовуються

для виявлення антибіотиків, таких як стрептоміцин, гентаміцин та неоміцин [27-28].

- Залізо. Наночастки заліза, такі як Fe_3O_4 та Fe_2O_3 є біосумісними. Вони активно досліджуються для використання у лікуванні раку(магнітна гіпертермія), керованої доставки ліків, генної терапії, аналізу ДНК, та магнітно-резонансної томографії (МРТ) [29].

Загалом технології на основі наночасток орієнтуються на можливості підвищення ефективності, стійкості та швидкості проходження вже існуючих процесів. Інші можливості для технологій на основі наночасток включають використання у навколишньому середовищі нанорозмірних нульово-валентних частинок заліза в якості засобів для очищення від хлорорганічних сполук, таких як поліхлоровані біфеніли (ПХБ). Ці частки здатні проникати у шари гірських порід у ґрунті і, таким чином, можуть нейтралізувати реакційну здатність хлорорганіків у глибоких водоносних шарах [23]. Інші сфери застосування наночасток - це ті, що впливають з маніпулювання або упорядкування речовини на нанорозмірному покритті. Також використовують так званий квантовий ефект часток (наприклад, квантові точки застосовують для чіткості зображень, як напівпровідники - для молекулярної електроніки тощо) [22].

1.1. Методи отримання наночасток

Для виготовлення наночасток було розроблено декілька шляхів синтезу. У кожного є як свої переваги, так і недоліки. На даний момент існує три основні методи їх синтезу – хімічний, фізичний та біологічний.

1.1.1. Методи хімічного синтезу

Основними методами хімічного синтезу є:

- Рідкофазний метод (дозволяє отримати наночастки з суворим контролем за розміром і формою).
- Двофазний, або метод мікроемульсії (наночастки мають широкий спектр розмірів, що стабілізуються поверхнево-активними речовинами (ПАР), забезпечують ефект утримання, що обмежує зародження частинок, їх ріст та агломерацію).
- Гель-золь метод (даний метод є хорошим шляхом для синтезу наноструктурованих оксидів металів. Він має деякі переваги, такі як можливість отримання матеріалів з заданою структурою згідно експериментальної умови, монодисперсність і хороший контроль розміру частинок, контроль мікроструктури та однорідність продукту реакції).
- Гель-аерозольний метод (розмір частинок залежить від початкового розміру матеріалу, також, важливо зазначити, що газо-аерозольна фаза дає високоякісну продукцію, але відсотковий вихід зазвичай досить низький, також обладнання, що використовується в цих методах, є дорогим, тому метод широко не використовується).
- Метод поліолів характеризується чітко окресленими формами та розмірами наночасток, що контролюються, може використовуватися в біомедичних добавках. Метод дозволяє краще контролювати середній розмір частинок.
- Метод гідротермальної реакції (розмір частинок можна змінювати за допомогою концентрації та часу перебування в реакторах/автоклавах) [30].

1.1.2. Методи фізичного синтезу

Випаровування, конденсація та лазерна абляція - найважливіші фізичні підходи для фізичного синтезу наночастинок. Відсутність забруднення розчинника в підготовлених тонких плівках та рівномірність розподілу наночастинок є перевагами методів фізичного синтезу порівняно з хімічними процесами.

Метод випаровування та конденсації дає можливість утворення малих наночастинок у високій концентрації. Утворення частинок дуже стабільне, тому, що температура поверхні нагрівача не коливається з часом. Цей фізичний метод може бути корисним як генератор наночастинок для тривалих експериментів з дослідження токсичності інгаляції, так і як пристрій калібрування обладнання для вимірювання наночастинок. Результати показали, що середній геометричний діаметр, геометричне стандартне відхилення та загальна кількість концентрацій наночастинок зростають із підвищенням температури поверхні нагрівача. Сферичні наночастки без агломерації спостерігалися навіть при високій концентрації з високою температурою поверхні нагрівача [31].

Також наночастки можуть бути синтезовані лазерною абляцією металевих сипучих матеріалів у розчині. Ефективність абляції та характеристики одержуваних частинок нано-срібла залежать від багатьох параметрів, включаючи довжину хвилі лазера, що вражає металеву мішень, тривалість лазерних імпульсів, лазерного струму, тривалість часу абляції та ефективне рідке середовище, з присутністю поверхнево-активних речовин [32].

1.2. Біологічний метод синтезу наночастинок

Хоча фізичні та хімічні методи більш популярні в синтезі наночастинок, використання токсичних хімічних речовин значно обмежує їх біомедичне застосування, зокрема в клінічній галузі. Тому розробка надійних, нетоксичних та екологічно чистих методів синтезу наночастинок має надзвичайно важливе значення для розширення їх біомедичного застосування [33].

Для подолання проблем токсичності, неекологічності та високої вартості дослідники знайшли «зелені шляхи», тобто природні джерела та їх продукти, які можна використовувати для синтезу частинок. «Зелений» синтез можна класифікувати як:

- використання таких організмів, як гриби, дріжджі (еукаріоти), бактерії та актиноміцети (прокаріоти),
- використання рослин та рослинних екстрактів
- використання шаблонів, таких як мембрани, ДНК вірусів.

1.2.1. Синтез за допомогою бактерій

Неорганічні матеріали виробляються бактеріями як поза-, так і внутрішньоклітинно. Це робить їх потенційними біофабрикатами для формування наночастинок благородних металів, таких як золота та ін. Основною умовою даного синтезу є біологічна сумісність металу з видом мікроорганізму, за допомогою якого збираються синтезувати наночастки.

Позаклітинний та внутрішньоклітинний синтез можна виконати незалежно від середовища, що використовується під час інкубації

бактерій. Цей вибір бактерій робить «зелений» синтез гнучким методом для широкомасштабного синтезу.

Разом з тим, використання мікроорганізмів має недоліки. Зокрема, бактерії продовжують рости після утворення наночасток. Крім цього, головним недоліком використання бактерій як нанофабрик є повільна швидкість синтезу і обмежена кількість розмірів і форм, що отримуються порівняно з іншими методами [34].

1.2.2. Синтез за допомогою грибів

Гриби мають потенціал для синтезу наночасток металів за рахунок біоакumuлюючої здатності металів та їх толерантності, високої здатності до зв'язування та внутрішньоклітинного поглинання, але, на відміну від бактерій, з грибами легше працювати під час досліджень [35].

Використання грибів надає деякі переваги. До них належить більш проста обробка біомаси та виділення набагато більшої кількості білків, що, як правило, різко підвищує рентабельність цього синтезу у порівнянні із використанням бактерій для отримання наночасток металів. Дослідження показують придатність та потенціал використання грибів для широкомасштабного синтезу наночасток порівняно з бактеріями.

1.2.3. «Зелений» синтез: синтез з використанням рослин та рослинних екстрактів

Останнім часом, все більше досліджень спрямовано на використання рослинних екстрактів у «зеленому» синтезі. Було продемонстровано, що утворення наночасток металів за допомогою рослинного екстракту може бути здійснено в розчині солі металу за короткий термін, навіть, при кімнатній температурі залежно від природи рослинного екстракту. Після відбору рослинного екстракту основними параметрами, що впливають на хід процесу, є концентрація екстракту, температура, сіль металу, рН та час контакту [36]. Окрім даних параметрів, головним питанням є вибір рослини, з якої можна було б використовувати екстракт. Переваги використання рослин для утворення наночасток полягають в тому, що вони легко доступні та безпечні в обробці та мають великий спектр активних агентів, які можуть сприяти утворенню наночасток. Для синтезу наночасток використовуються такі рослинні частини, як коріння, стебло, насіння та листя [37].

Основними сполуками, які впливають на відновлення та стабілізацію наночасток, є біомолекули, тобто полісахариди, феноли, алкалоїди, флавоноїди, амінокислоти та білки [38-39].

Встановлено, що «зелений» синтез із використанням рослинних екстрактів є значно швидшим та менш енерговитратним, ніж синтез за допомогою бактерій та грибів. Використання рослинних екстрактів у зеленому синтезі привертає увагу завдяки його швидкості, забезпечуючи одностадійну техніку, економічний протокол, непатогенний та екологічно чистий синтез наночасток [40].

1.3. Наночастки заліза та їх використання

Магнітні наночастки (MNPs) є передовими наномасштабними матеріалами з унікальними властивостями, а тому їх можна використовувати у різних сферах, зокрема, вони відіграють центральну роль у широкому діапазоні біомедичних застосувань, таких як клітинна терапія [41], фототермічний ефект [42], тканинна інженерія [43], регенеративна медицина [44], діагностика [45] та візуалізація [46]. Наприклад, наночастки Fe_3O_4 відомі своєю фотокаталітичною і фотоокислювальною властивостями. Завдяки цьому та здатності полегшувати клітинний і молекулярний рівень біологічних взаємодій, MNPs розглядаються як успішні контрастні агенти для магнітно-резонансної томографії (МРТ) в наномедицині [47].

Завдяки унікальній можливості поєднувати властивості наночасток благородних металів та напівпровідникові «квантові точки», наночастки знаходять дедалі ширше застосування у сфері біологічних досліджень. Квантові точки мають високу фотостабільність та яскравість і відповідають більшості критеріїв, що висуваються до флуоресцентних матеріалів у біології. Тому їх використовують в протипухлинній терапії, для прижиттєвої візуалізації внутрішньоклітинних структур, імунофлуоресцентного мічення білків, детектування токсинів тощо [48-50].

Застосування MNPs набуває популярності не лише в медицині, а й в захисті природного середовища, адже останнім часом почали проводити дослідження з метою усунення розливів нафти за допомогою магнітних наночасток [51].

Традиційні технології отримання наночасток, в основу яких покладено фізичні та хімічні методи, енерговитратні та передбачають використання токсичних речовин. До того ж ефективність застосування наноматеріалів у біології, біотехнології та біомедицині істотно залежить як від розміру,

форми, складу, так і від інших властивостей MNPs [52]. З огляду на це, надзвичайно актуальним наразі є розвиток продуктивних екологічно-безпечних та економічно доцільних методів синтезу наночастинок за допомогою біологічних систем [53]. «Зелений» синтез наночастинок металів з використанням рослин отримує все більше уваги як відповідна альтернатива хімічним процедурам і фізичним методам. Саме тому синтез наночастинок металів з використанням рослинних екстрактів розглядаються як такі, що здатні успішно конкурувати з традиційними хімічними та фізичними методами.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

У якості матеріалу для досліджень використовували культури «бородатих» коренів рослин *Artemisia annua* та *Artemisia tilesii* з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Корені вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге та Скуга [54] із зменшеним удвічі вмістом макросолей (1/2МС) при температурі +26°C протягом чотирьох тижнів.

2.2. Приготування екстрактів

Для приготування екстрактів використовували ліофілізовані корені, які подрібнювали на Retsch MM400 (Німеччина). Для приготування екстрактів матеріал змішували з 70% етанолом у співвідношенні 10:1. Екстракцію здійснювали на шейкері Gio Gyrotory Shaker, New Brunswick Scientific, USA при температурі +28° протягом 2 днів. Екстракти центрифугували на Centrifuge 5415C, Eppendorf Geratebau, West Germany при 14000 g протягом 10 хвилин. Супернатант відбирали та зберігали у морозильній камері при -20°C.

2.3. Визначення загального вмісту флавоноїдів у екстрактах

Вміст флавоноїдів у супернатанті визначали, використовуючи метод, що описаний нижче, вимірювали на спектрофлуориметрі (Флуорат) ($\lambda = 510$ нм). До 0,25 мл екстракту додавали 1 мл дистильованої води та 0,075 мл NaNO_2 (5%), перемішували та залишали на 5 хвилин. Потім додавали 0,075 мл AlCl_3 (10%), знову перемішували та залишали на 5 хвилин. Після завершення відведеного часу додавали 0,5 мл NaOH (1M) та 0,6 мл дистильованої води [55]. Загальний вміст флавоноїдів визначали за формулою $y = 1,0884 \cdot x$ ($R^2 = 0,9884$).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакета програм Microsoft Excel.

2.4. Визначення відновлювальної активності екстрактів

Здатність екстрактів відновлювати іони заліза (Fe_3^+) визначали як описано в [56]. 31-250 мкл екстракту змішували з 0,312 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,6) та 0,312 мл 1% фериціаніду калію та інкубували при 50 °C протягом 20 хв. Потім додавали 0,312 мл 10% трихлороцтової кислоти, і реакційну суміш переносили в мікропробірки Еппендорф для центрифугування при 12000 об/хв протягом 10 хв. Потім 1,25 мл супернатанту змішували з 1,25 мл дистильованої води та 0,25 мл 0,1% хлористого заліза. Поглинання вимірювали при $\lambda = 700$ нм. Еквівалентні концентрації ($\text{EC}_{0,5}$) як кількість висушеного кореневого матеріалу, необхідного для отримання $\text{OD} = 0.5$, розраховували на основі рівнянь

залежності оптичної щільності від концентрації екстракту. Рівняння були отримані методом лінійної регресії. Рутин використовували як позитивний контроль.

2.5. Отримання наночасток заліза

2.5.1. Визначення особливостей синтезування наночасток заліза з використанням різних солей заліза

Для приготування наночасток використовували розчини: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5 %; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 %; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 5%; $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 % (див. табл. 2.1). Кількість екстракту у реакційній суміші становила 0.5 мл. рН доводили до 9-10 од. з використанням 10% розчину аміаку.

Таблиця 2.1

Склад сумішей солей Fe, що використовувались для синтезу наночасток.

№	Вміст компонентів				Склад розчину
	FeCl_3	FeCl_2	FeSO_4	CoCl_2	
1	-	1 мл	1 мл	-	$\text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4$
2	-	1 мл	1 мл	0,1 мл	$\text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4 + \text{CoCl}_2$
3	1 мл	-	1 мл	-	$\text{FeCl}_3 + \text{FeSO}_4$
4	1 мл	-	1 мл	0,1 мл	$\text{FeCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{CoCl}_2$
5	0,5 мл	0,5 мл	1 мл	-	$\text{FeCl}_3 + \text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4$
6	0,5 мл	0,5 мл	1 мл	0,1 мл	$\text{FeCl}_3 + \text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4 + \text{CoCl}_2$

2.5.2. Синтезування наночастинок з використанням «бородатих» коренів

Для отримання наночастинок заліза до суміші, що складалася з 1 мл розчину $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5,4% розчин), 1 мл $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,9%), 0,1 мл $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2%), додавали 0,5 мл відповідного екстракту (див. табл. 2.2 та 2.3).

Таблиця 2.2

Екстракти, використані для отримання наночастинок заліза.

№	Зразок екстракту
1*	<i>Artemisia tilesii</i> , корені (контроль) у 70% етанолі
2	<i>Artemisia tilesii</i> , листя (контроль) у 70% етанолі
3*	<i>Artemisia tilesii</i> , транс. корені 1-2 у 70% етанолі
4**	<i>Artemisia tilesii</i> , транс. корені 1-4 у 70% етанолі
5*	<i>Artemisia tilesii</i> , транс. корені 1-5 у 70% етанолі
6**	<i>Artemisia tilesii</i> , транс. корені 1-10 у 70% етанолі
7**	<i>Artemisia tilesii</i> , транс. корені 1-13 у 70% етанолі
8*	<i>Artemisia tilesii</i> , транс. корені 1-16 у 70% етанолі
9	<i>Artemisia annua</i> , листя (контроль) у 70% етанолі
10	<i>Artemisia annua</i> , корені (контроль) у 70% етанолі
11*	<i>Artemisia annua</i> , транс. корені №17К у 70% етанолі
12*	<i>Artemisia annua</i> , транс. корені №19К у 70% етанолі
13*	<i>Artemisia annua</i> , транс. корені №20К у 70% етанолі
14**	<i>Artemisia annua</i> , транс. корені №A41 у 70% етанолі

* Колір змінився відразу на темно-зелений після додавання екстракту (рН=2)

** Колір слабо змінився одразу після додавання екстракту (рН=2)

Таблиця 2.3

Склад реакційної суміші, використаної для отримання наночасток заліза
рН = 9-10 (доведення 10% розчином аміаку).

Компоненти суміші	Кількість, мл
5,4% FeCl ₃ * 6H ₂ O	1*
1,9% FeSO ₄ * 7H ₂ O	1*
2% CoCl ₂ * H ₂ O	0,1*
Екстракт	0,5*

*Для зразків на основі *Artemisia tilesii* кількість реактивів було збільшено в двічі.

2.6. Аналіз наночасток з використанням електронної трансмісійної мікроскопії

Форму та розміри наночасток вивчали з використанням електронного мікроскопу TEM 1230 JEOL, Токуо, Япон у центрі колективного користування Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Отримання екстрактів

У якості матеріалу для досліджень використовували культури «бородатих» коренів рослин *Artemisia annua* та *Artemisia tilesii*. Для приготування екстрактів подрібненні ліофілізовані корені екстрагували за допомогою етанолу, потім центрифугували та збирали супернатант, який і використовувався для подальших досліджень.

3.2.1. Визначення загального вмісту флавоноїдів в зразках на основі екстрактів з *Artemisia annua*

У результаті дослідження виявлено, що вміст флавоноїдів в контрольних рослинах і у трансгенних лініях значно відрізняється (див. рис. 3.1). Вміст флавоноїдів у коренях контрольних рослин становив $\pm 7,5$ мг/г, вміст у контрольних листках був менше і дорівнював $\pm 5,7$ мг/г. У трансгенних лініях вміст флавоноїдів варіював від ± 24 мг/г (зразок №14) до ± 35 мг/г (зразок №11).

Отже, вміст флавоноїдів в усіх трансгенних лініях значно вищий, ніж у контрольних рослин. Найкраще це помітно у 11 зразка, адже його вміст був у 4,6 разів більше ніж у коренів та у 6,1 разів більше ніж у листків контрольних рослин.

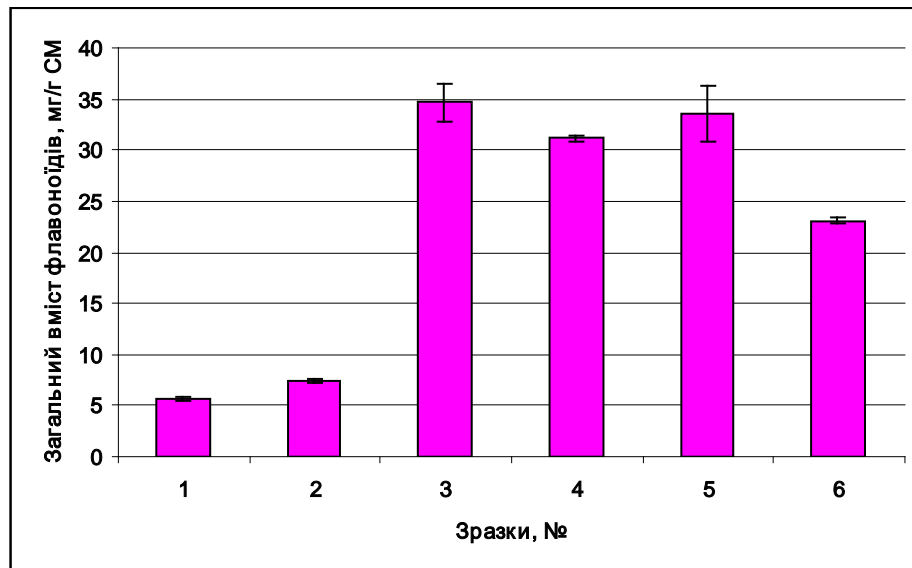


Рис. 3.1 – Загальний вміст флавоноїдів у екстрактах з листків (1), коренів (2) контрольних рослин *Artemisia annua* та «бородатих» коренів № 11-14 (3-6)

3.2.2. Визначення загального вмісту флавоноїдів в зразках на основі екстрактів з *Artemisia tilesii*

Також були дослідженні зразки з екстрактів *Artemisia tilesii* на загальний вміст флавоноїдів. З рис. 3.2. бачимо, що вміст флавоноїдів в контрольних рослинах і у трансгенних лініях значно відрізняється. Вміст флавоноїдів у коренях контрольних рослин становив $\pm 41,4$ мг/г, вміст у контрольних листках був менше і дорівнював $\pm 21,2$ мг/г. У трансгенних лініях вміст флавоноїдів варіював від $\pm 35,4$ мг/г (зразок №7) до ± 54 мг/г (зразок №5).

Отже, вміст флавоноїдів в трансгенних лініях значно вищий (винятком є зразки № 4, 6, 7, адже вміст флавоноїдів був значно вищий ніж у контрольних листках, але менший ніж у контрольних коренях), ніж у контрольних рослин. Найкраще це помітно у 5 зразка, адже його вміст був у

1,3 разів більше ніж у коренів та у 2,6 разів більше ніж у листків контрольних рослин.

Отже, можна зробити висновки, що після трансформації відбулись зміни, що призвели до активації синтезу флавоноїдів.

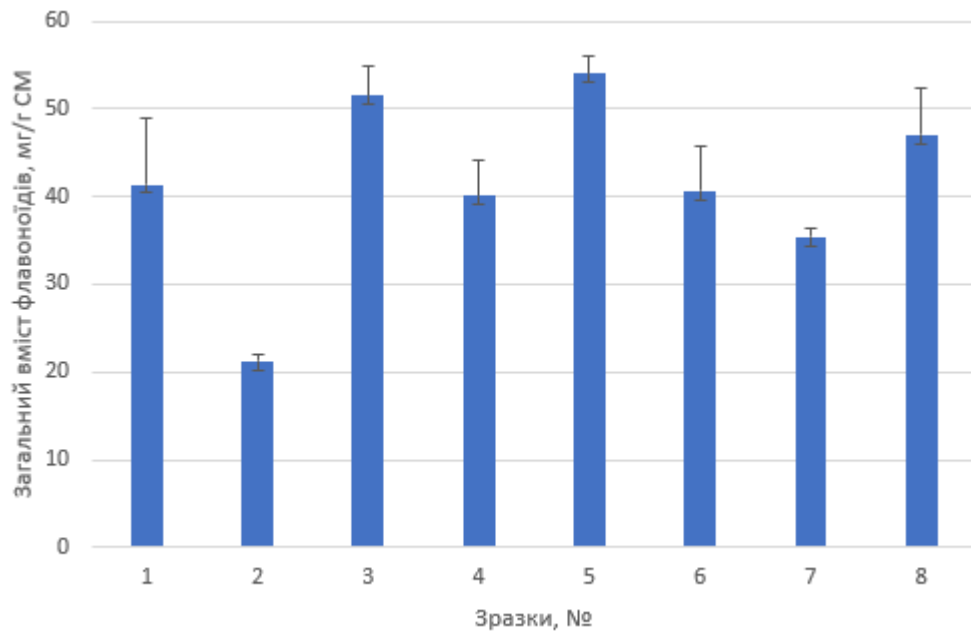


Рис. 3.2 – Загальний вміст флавоноїдів у екстрактах з коренів (1), листків (2) контрольних рослин *Artemisia tilesii* та «бородатих» коренів № 3-8 (3-8)

3.3.1. Визначення відновлювальної активності *Artemisia annua*

На Рис. 3.2 подано результати визначення відновлювальної активності екстрактів відповідно до здатності відновлювати Fe_3^+ . На діаграмі видно, що відновлювальна активність у екстрактах з кореня контрольних рослин значно вища, ніж у контрольних листків. Відновлювальна активність у чотирьох екстрактах на основі трансгенних коренів значно відрізняється, приблизний діапазон становить від $EC = \pm 0,2$ (зразок 17K) до $EC = \pm 1,5$ (зразок A41).

Отже, найвища відновлювальна активність була у зразка 17К, а найнижча у А41.

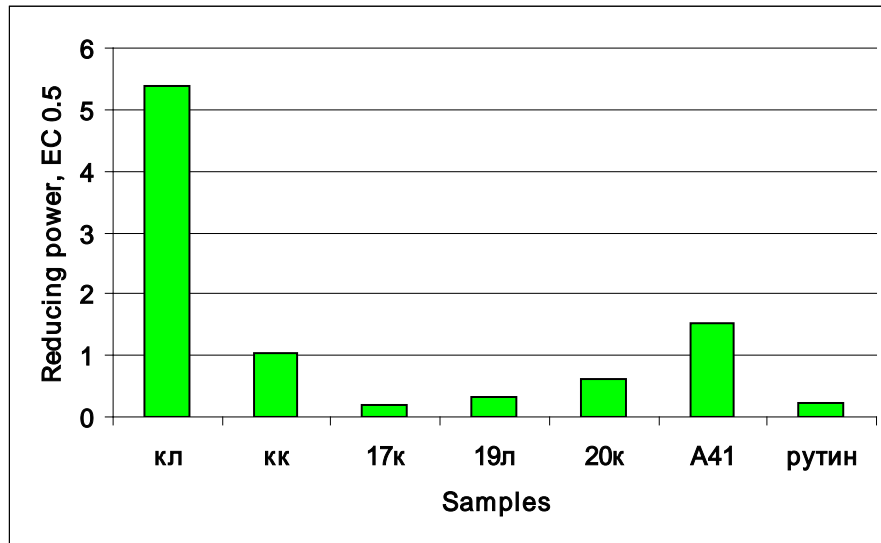


Рис. 3.3 – Відновлювальна активність екстрактів з листків (1), коренів (2) контрольних рослин *Artemisia annua* та «бородатих» коренів № 11-14 (3-6); 7 – рутин у концентрації 1 мг/мл

3.3.2. Визначення відновлювальної активності *Artemisia tilesii*

У екстрактів на основі *Artemisia tilesii* бачимо схожу ситуацію, котра описана вище, адже відновлювальна активність у екстрактів з кореня контрольних рослин значно вища, ніж у контрольних листків. Відновлювальна активність у шести екстрактах на основі трансгенних коренів значно відрізняється, приблизний діапазон становить від $EC = \pm 0,12$ (зразок 5) до $EC = \pm 0,23$ (зразок 6). Отже, найвища відновлювальна активність була у зразка 5, а найнижча у 6 (див. рис. 3.4).

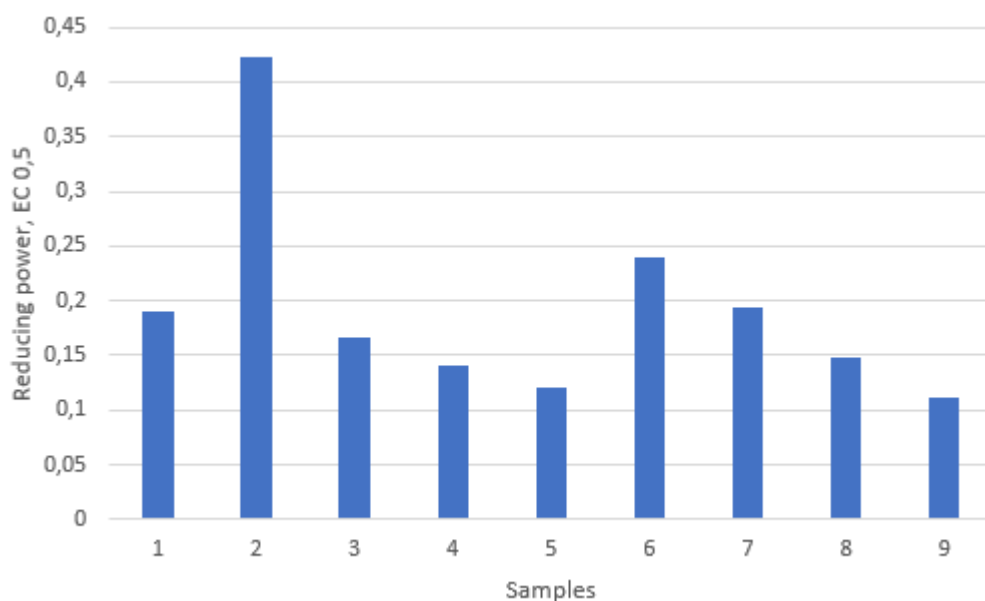


Рис. 3.4 – Відновлювальна активність екстрактів з коренів (1), листків (2) контрольних рослин *Artemisia tilesii* та «бородатих» коренів 3-8, 9 – рутин у концентрації 1 мг/мл

Порівнюючи дані про вміст флавоноїдів та відновлювальну активність зразків, можна припустити, що відновлювальна властивість екстрактів залежить від вмісту флавоноїдів (чим більша концентрація флавоноїдів – тим вища відновлювальна активність), а відновлювальна активність, в свою чергу, впливає на здатність до утворення NPs, адже за високої активності наночастки утворюються навіть при низькому рН.

3.4. Визначення впливу складу реакційної суміші на формування наночастинок заліза

В даному експерименті використовували лише один вид екстракту виготовлений з кореня *Artemisia annua*, змінюючи тільки суміш солей Fe (Табл. 2.1). Метод виготовлення екстрактів викладено у розділі 2.2.

При використанні суміші $\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4$ було отримано сферичні наночастки з розміром від 6 - 8 нм (Рис. 3.5).

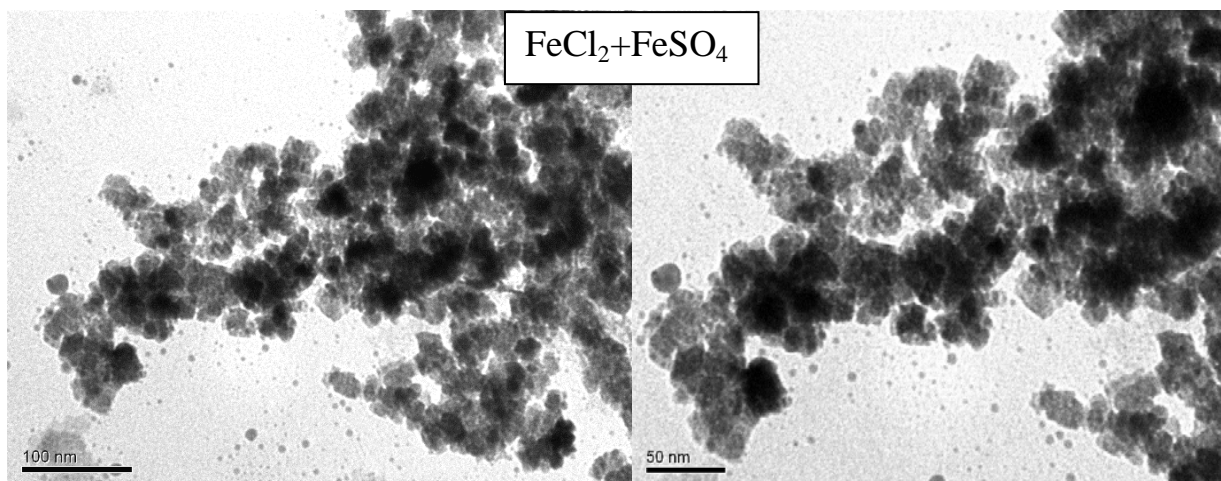


Рис. 3.5 – TEM зразка з використанням суміші $\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4$

При використанні суміші $\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4+\text{CoCl}_2$ було отримано сферичні наночастки з розміром від 4 - 7 нм (Рис. 3.6).

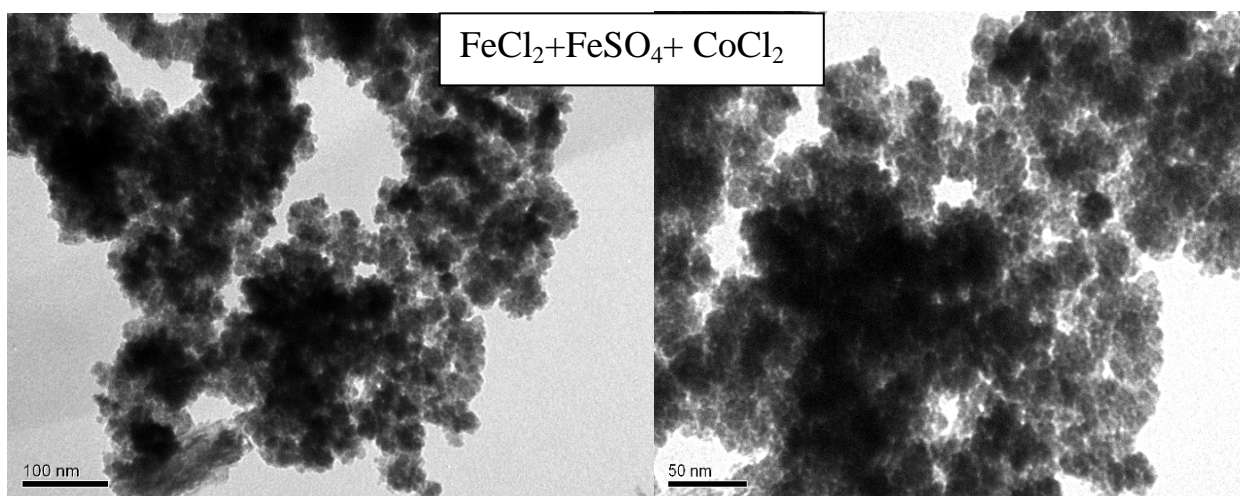


Рис. 3.6 – TEM зразка з використанням суміші $\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4+\text{CoCl}_2$

При використанні суміші $\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4$ було отримано сферичні наночастки з розміром від 8 - 12 нм (Рис. 3.7).

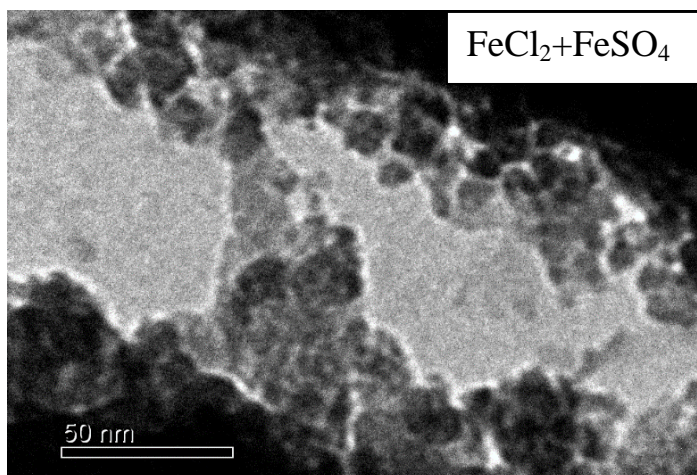


Рис. 3.7 – TEM зразка з використанням суміші $\text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4$

При використанні суміші $\text{FeCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{CoCl}_2$ було отримано сферичні наночастки з розміром від 4 - 6 нм (Рис. 3.8).

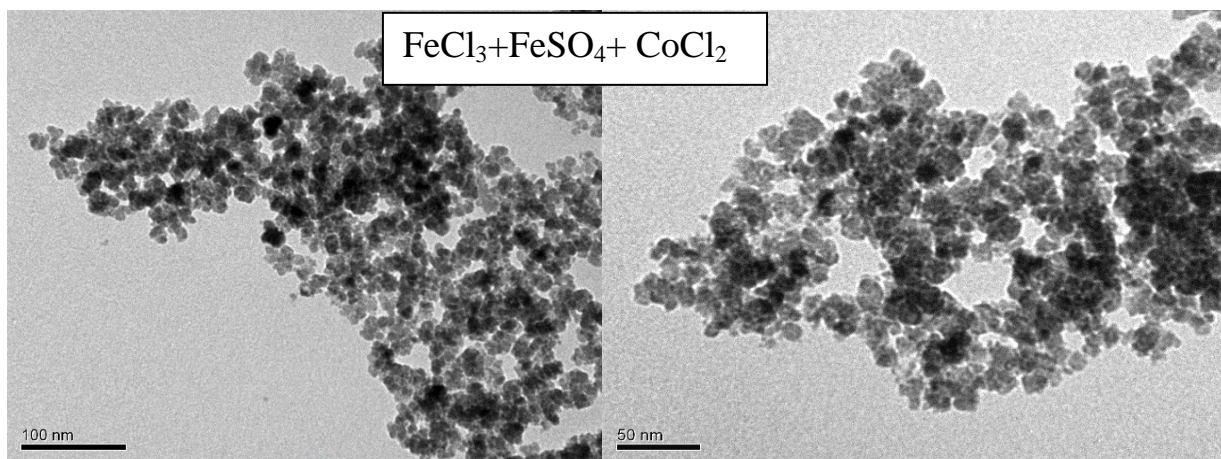


Рис. 3.8 – TEM зразка з використанням суміші $\text{FeCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{CoCl}_2$

При використанні суміші $\text{FeCl}_3 + \text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4$ було отримано сферичні наночастки з розміром від 8 - 18 нм (Рис. 3.9).

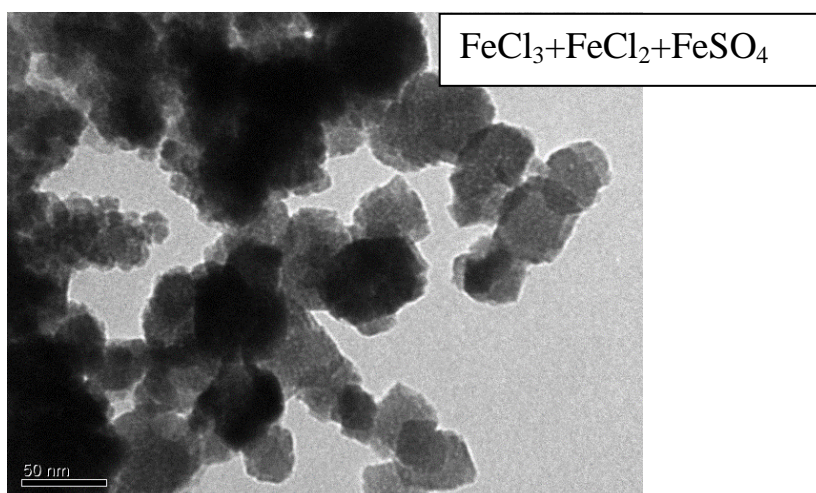


Рис. 3.9 – TEM зразка з використанням суміші $\text{FeCl}_3+\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4$

При використанні суміші $\text{FeCl}_3+\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4+\text{CoCl}_2$ було отримано сферичні наночастки з розміром від 4 - 6 нм (Рис. 3.10).

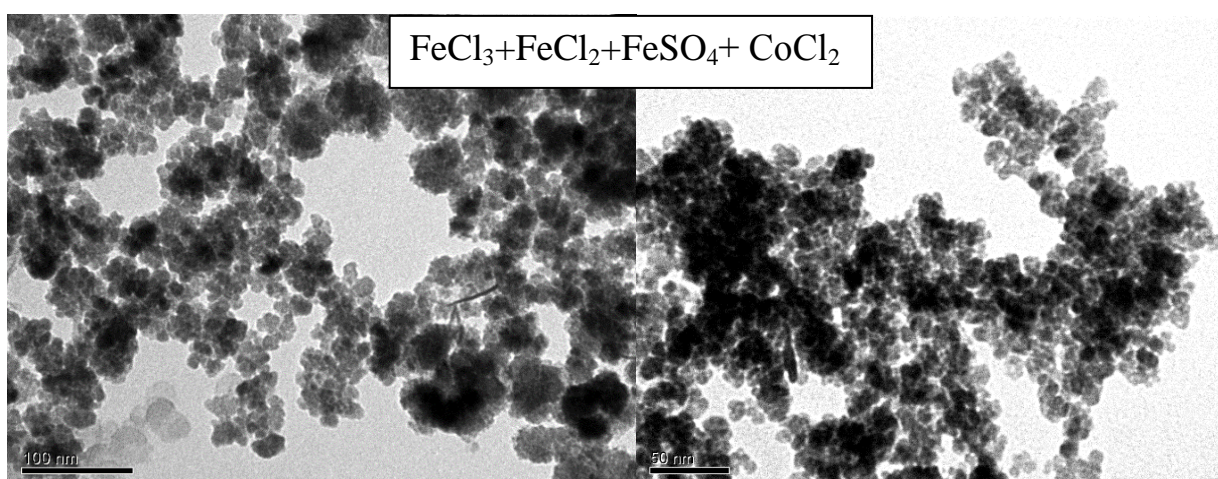


Рис. 3.10 – TEM зразка з використанням суміші $\text{FeCl}_3+\text{FeCl}_2+\text{FeSO}_4+\text{CoCl}_2$

Отримані результати свідчать, що хімічний склад розчину має вплив на розмір і якість часток. Розміри частинок коливались в діапазоні від 4 до 18 нм. Найкращою для синтезу виявилась суміш $\text{FeCl}_3+\text{FeSO}_4+\text{CoCl}_2$, адже частки синтезовані за допомогою цієї суміші були найменшими. А чим менший розмір, тим більшою має бути біоактивність, яка залежить у значній мірі від площі поверхні. Саме тому цю суміш було обрано для подальших досліджень.

3.5. Використання різних екстрактів при сталій суміші солей

Для утворення наночасток заліза (Рис. 3.11 та 3,12) використовували сталу суміш солей (Табл. 2.3), змінюючи тільки екстракти (Табл. 2.2). Останні отримували за методикою, наведеною у розділі 2.2. Порівнювали процес утворення наночасток при використанні екстрактів з листків та коренів контрольних рослин, а також різних ліній «бородатих» коренів. У зразках, у яких використовували екстракти з трансгенних коренів відбувалась зміна кольору (з жовтого на коричневий) відразу після додавання суміші солі Fe, навіть без доведення рН = 10 (Рис. 3.13). За результатами досліджень було виявлено, що зразки, які змінили колір навіть за низького рН, мали високий вміст флавоноїдів (у зразків 11 і 13 вміст флавоноїдів був у майже 6 разів вищим за контроль, а у зразків 12 та 14 перевищував контроль у 5 і 4 рази відповідно) та високу відновлювальну активність (зразки 11-13 мали значно вищу активність у порівнянні з контролем, і, лише, зразок 14 мав активність нижче ніж контроль коренів). Це свідчить про участь флавоноїдів у процесі утворення наночасток заліза.

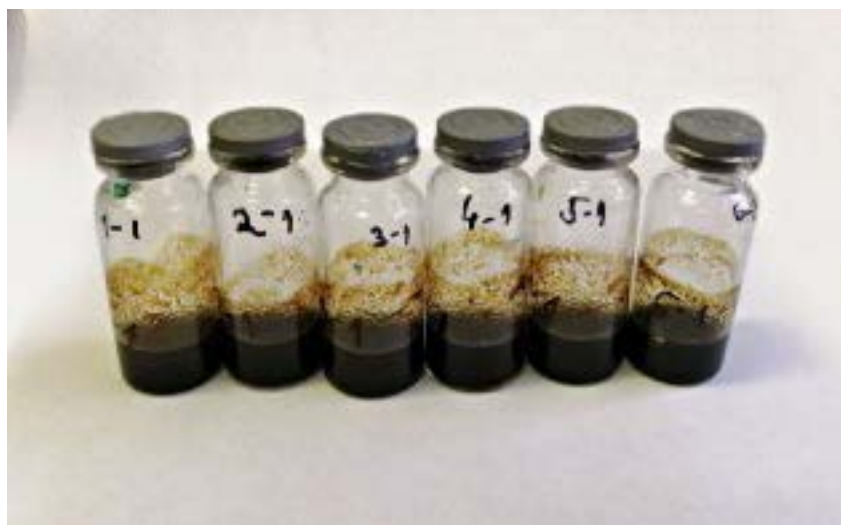


Рис. 3.11 – Отримання наночасток заліза з використанням екстрактів, з ліва на право зразки № 9 – 14 (див. Табл. 2.2)



Рис. 3.12. – Отримання наночасток заліза з використанням екстрактів, з ліва на право зразки №1 – № 8



Рис. 3.13 – Зміна кольору одного зі зразків (№12) одразу після додавання суміші солей Fe, без доведення рН до 10.

Отже, екстракти з коренів нетрансформованих рослин можуть бути використані для отримання наночасток заліза. Разом з тим, керуючись даними про вміст флавоноїдів та відновлювальну активність, можна зробити висновок про доречне використання екстрактів з «бородатих» коренів.

3.6.1. Аналіз наночасток синтезованих з використанням екстрактів на основі *Artemisia annua* з використанням трансмісійної мікроскопії

Проведено мікроскопічне дослідження наночасток заліза, отриманих з використанням екстрактів з *Artemisia annua* та (див. табл. 2.2). Для виконання даного експерименту, на основі попереднього дослідження, була обрана стала суміш солі ($\text{FeCl}_3 + \text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4$), яку додавали до екстрактів на основі трансгенних коренів та контрольних рослин.

У варіанті з використанням екстрактів з листків № 9 (див. Рис. 3.15) та коренів контрольних рослин № 10 (див. Рис. 3.16), було синтезовано сферичні наночастки розмірами від 6-8 нм та 4-6 нм відповідно. При використанні екстрактів на основі трансгенних коренів (див. Рис 3.17-3.20) було синтезовано сферичні наночастки з діаметром від 2 нм. Найменші FeNPs утворились при використанні екстракту з трансгенних коренів зразку №13 (з коренів 20к), найбільші – №12 (екстракт коренів 19к). розподіл за розмірами наночасток наведено нижче (див. рис. 3-14). Важливо зазначити, що при додаванні суміші солі до екстрактів на основі трансгенних коренів – колір змінювався з жовтого на блідо-коричневий (початок синтезу наночасток) ще за $\text{pH}=2$.

Отже, можна припустити, що більша відновлювальна активність корелює зі здатністю до синтезу наночасток.

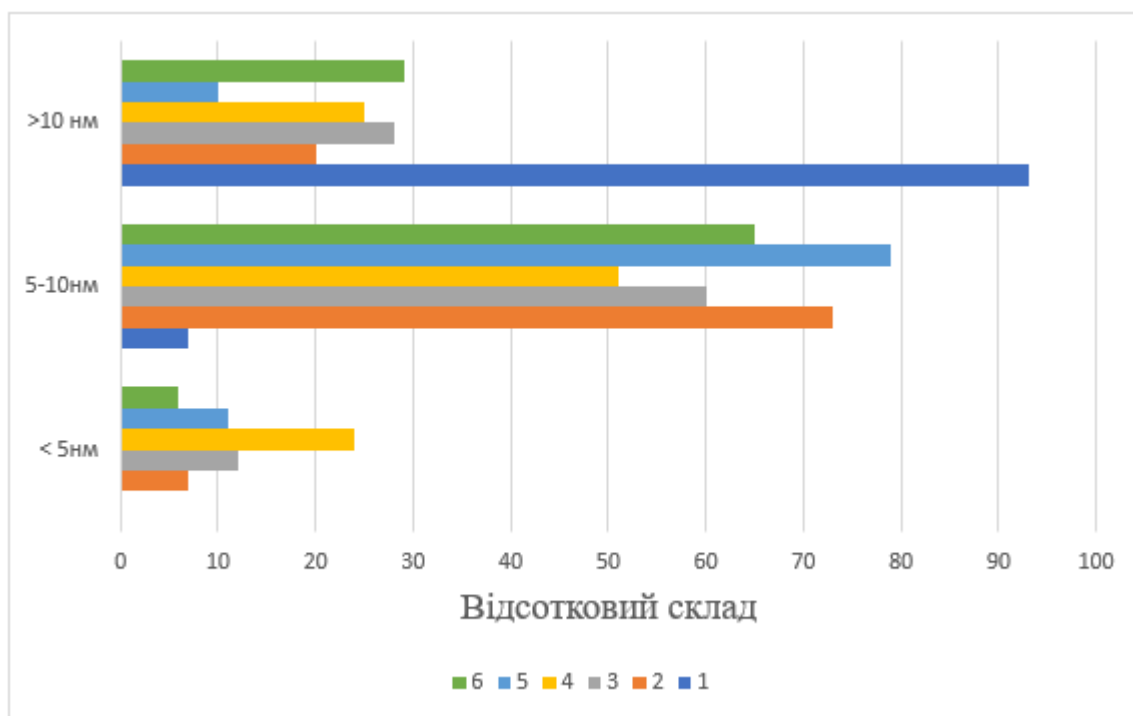


Рис. 3.14 – Розподіл за розмірами наночасток з використанням екстрактів з листків (1), коренів (2) контрольних рослин *Artemisia annua* та «бородатих» коренів № 11-14 (3-6).

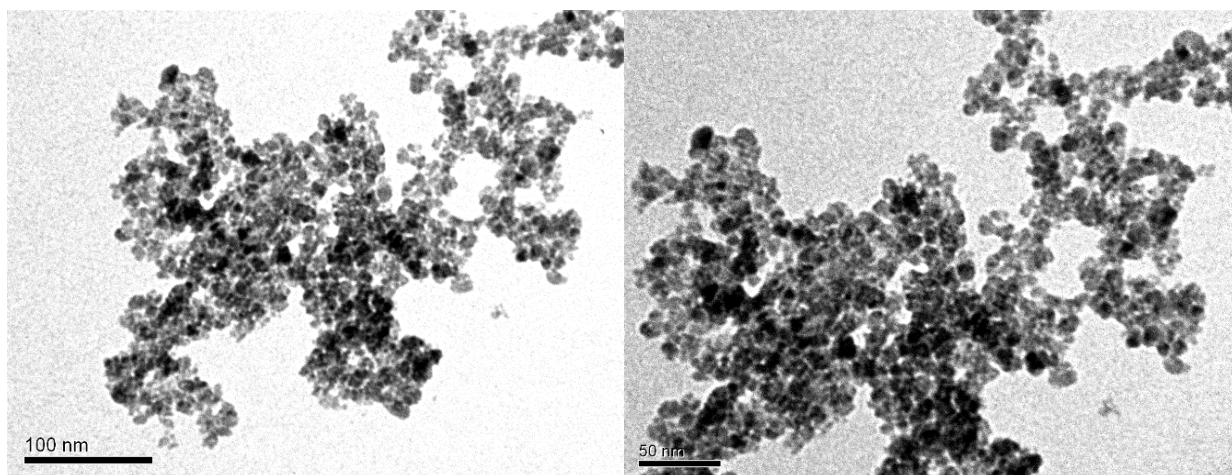


Рис. 3.15 – TEM зразка №9 (екстракт контрольних листків, 70% етанол)

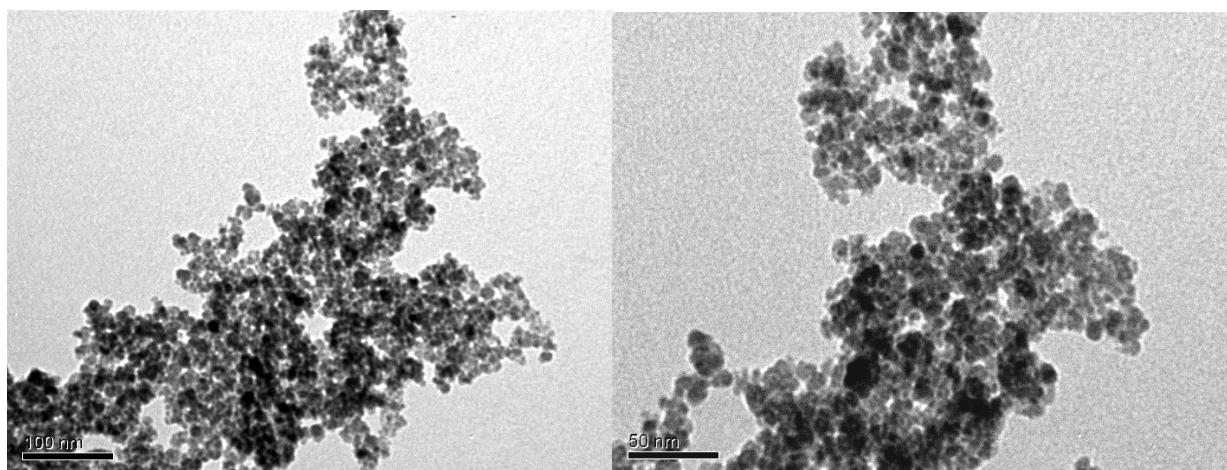


Рис. 3.16 – ТЕМ зразка №10 (екстракт контрольних коренів, 70% етанол)

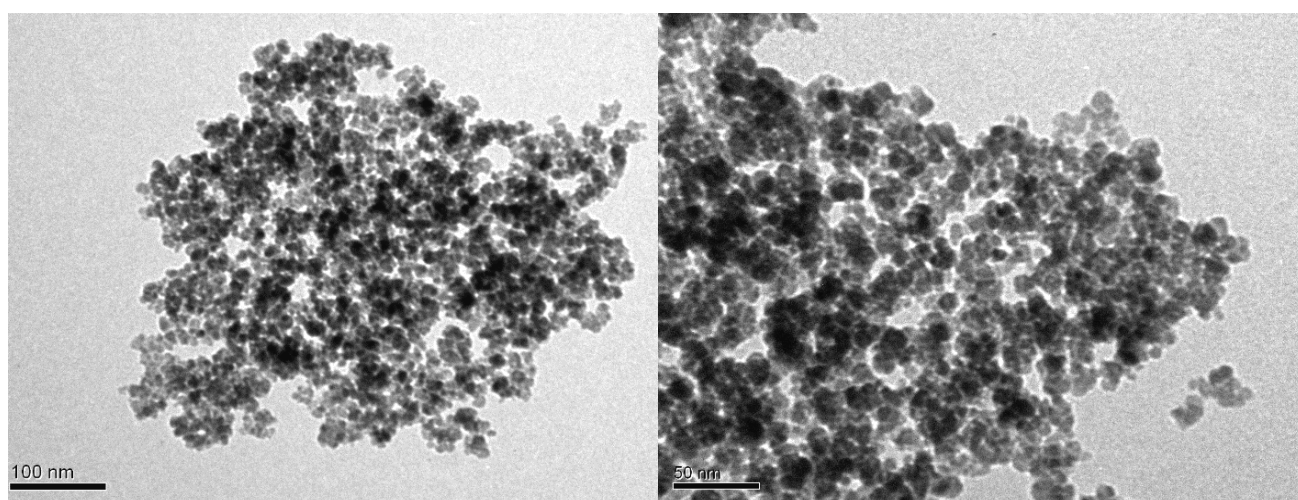


Рис. 3.17 – ТЕМ зразка №11 (екстракт «бородатих» коренів 17к, 70% етанол)

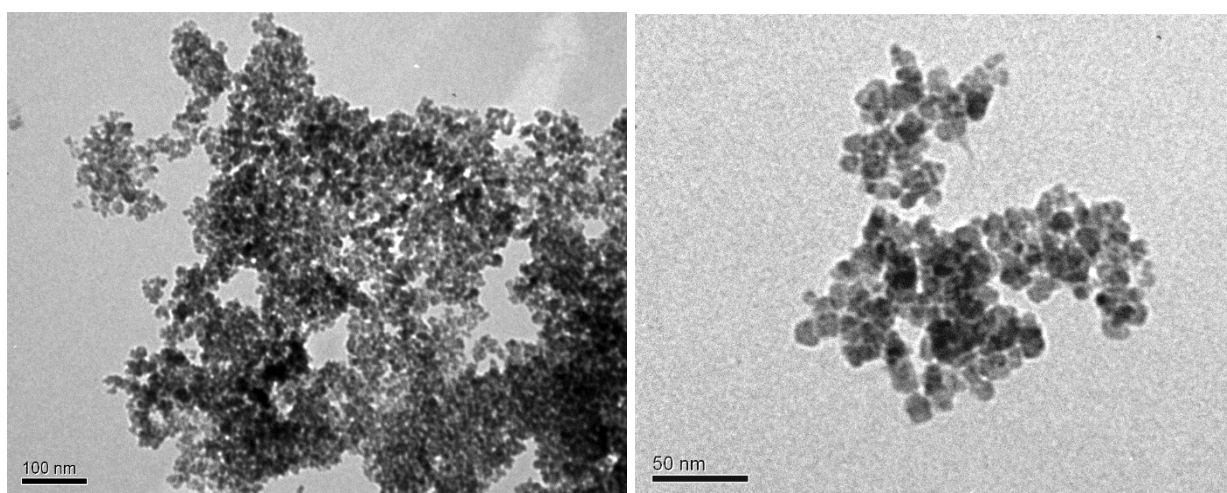


Рис. 3.18 – ТЕМ зразка №12 (екстракт «бородатих» коренів 19к, 70% етанол)

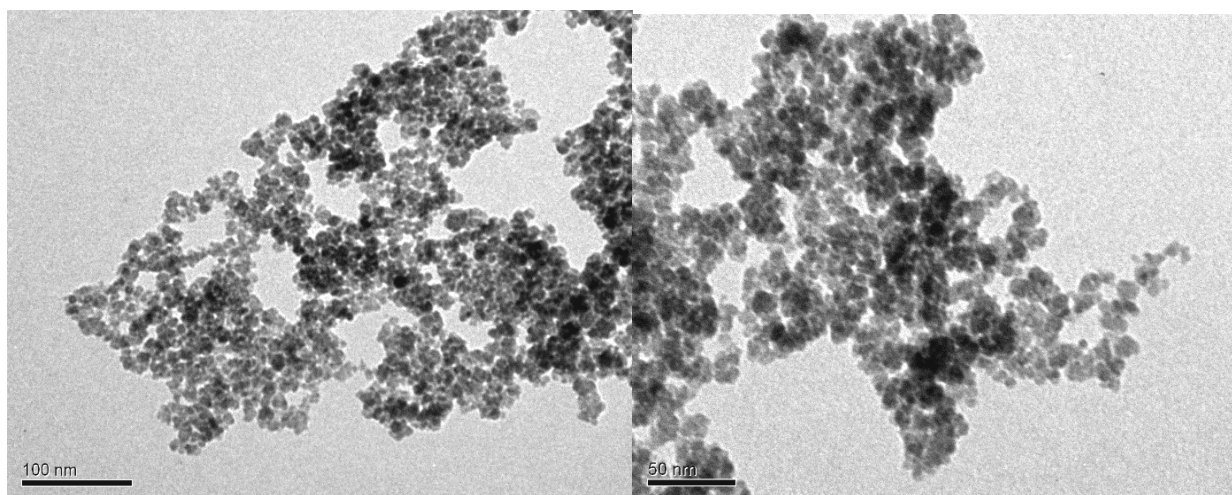


Рис. 3.19 – ТЕМ зразка №13 (екстракт «бородатих» коренів 20к, 70% етанол)

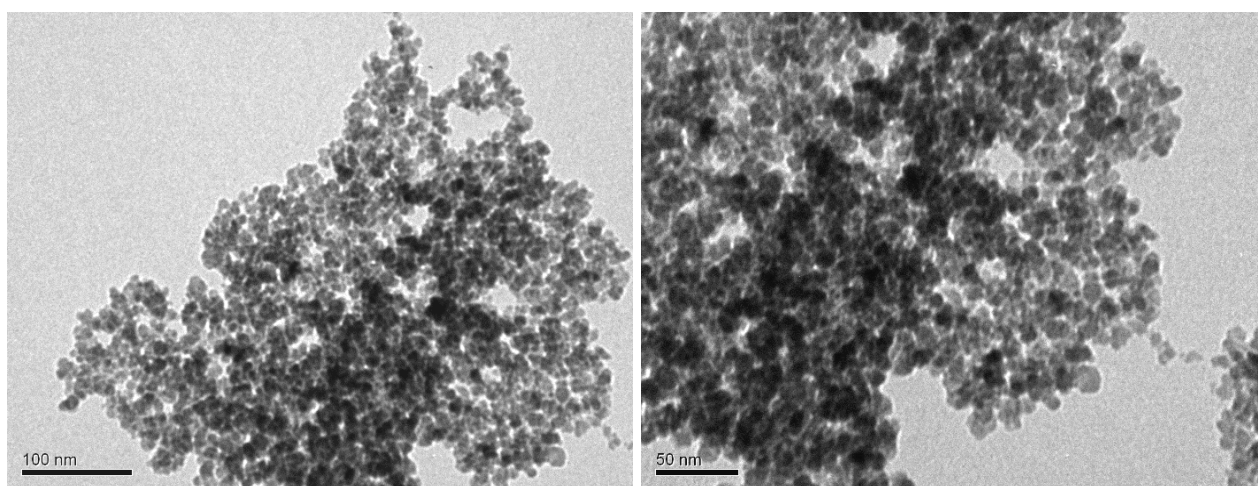


Рис. 3.20 – ТЕМ зразка №14 (екстракт «бородатих» коренів №А41, 70% етанол)

Таким чином було встановлено, що екстракти з нетрансформованих рослин (зразок 1-1 та 1-2) можуть бути використані для отримання наночасток заліза. Разом з тим, використання екстрактів з «бородатих» коренів дозволяє отримати наночастки заліза меншого розміру – від 2 до 10 нм.

3.6.2. Аналіз наночасток синтезованих з використанням екстрактів на основі *Artemisia tilesii* з використанням трансмісійної мікроскопії

Проведено мікроскопічне дослідження наночасток заліза, отриманих з використанням екстрактів з *Artemisia tilesii* (див. табл. 2.2). Для виконання даного експерименту, на основі попереднього дослідження, була обрана стала суміш солі ($\text{FeCl}_3 + \text{FeCl}_2 + \text{FeSO}_4$), яку додавали до екстрактів на основі трансгенних коренів та контрольних рослин.

У варіанті з використанням екстрактів з коренів зразок 1 (див. Рис. 3.22) було синтезовано сферичні наночастки розмірами від 9-26 нм. При використанні листків контрольних рослин зразок 2 (див. Рис. 3.23), було синтезовано кубічні наночастки розмірами від 15-23 нм. При використанні екстрактів на основі трансгенних коренів (див. Рис 3.23-3.26 та 3.28-3,29) було синтезовано кубічні наночастки з діаметром від 7 до 42 нм. На основі екстракту зразку № 6 (див. рис 3,27) були синтезовані сферичні наночастки діаметром від 11 до 35 нм. Найменші FeNPs утворились при використанні екстракту з трансгенних коренів зразку номер 5, найбільші – зразок 6. Розподіл за розмірами наночасток наведено нижче (див. рис. 3-21). Важливо зазначити, що при додаванні суміші солі до екстрактів на основі трансгенних коренів – колір змінювався з жовтого на блідо-коричневий (початок синтезу наночасток) ще за $\text{pH}=2$.

Отже, можна припустити, що більша відновлювальна активність корелює зі здатністю до синтезу наночасток.

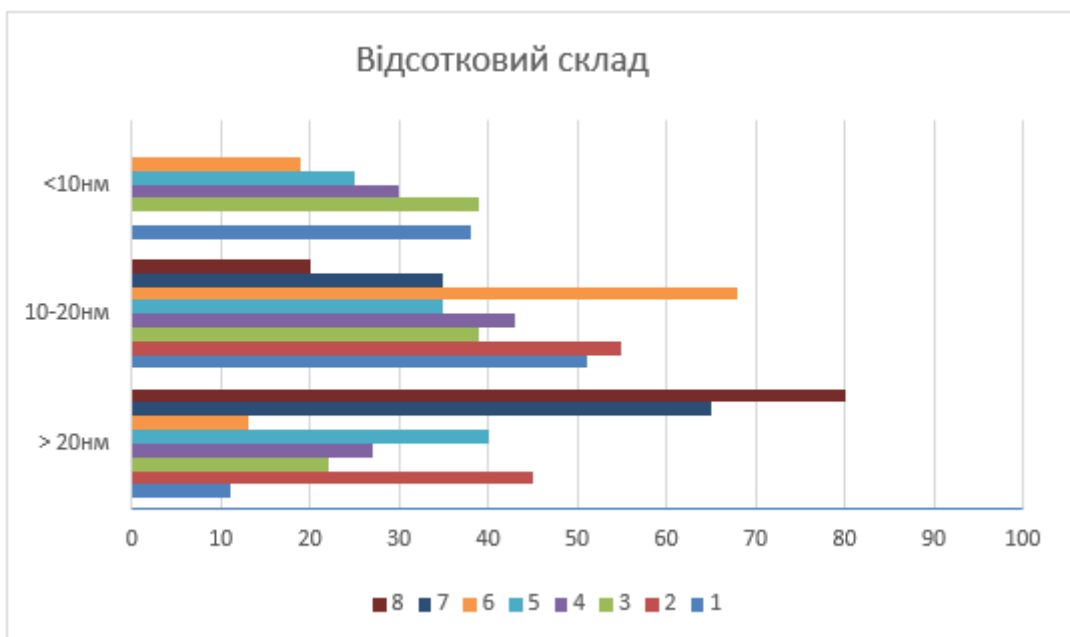


Рис. 3.21 – Розподіл за розмірами наночастинок з використанням екстрактів з коренів (1), листків (2) контрольних рослин *Artemisia tilesii* та «бородатих» коренів № 3-6 (3-6).

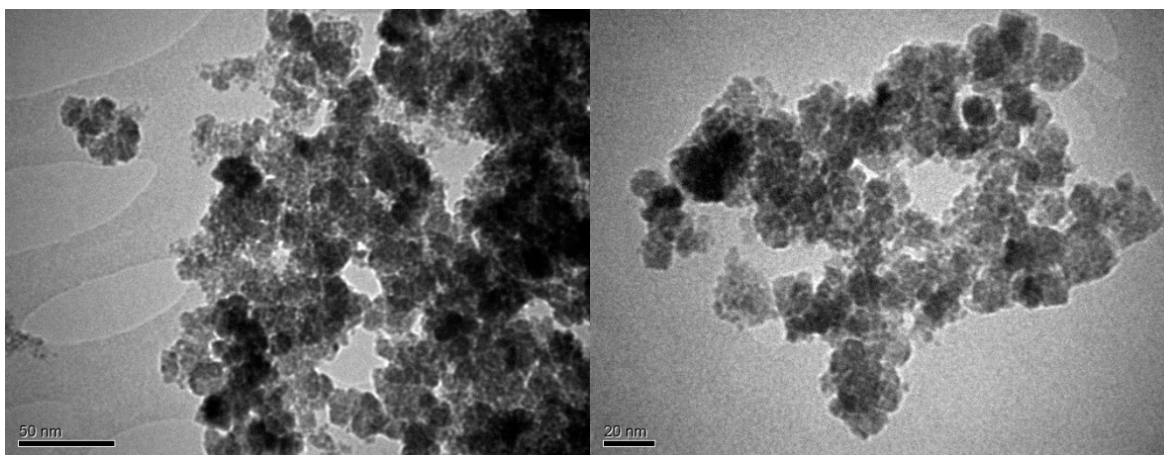


Рис. 3.22 – TEM зразка 1 (*Artemisia tilesii*, корені (контроль) у 70% етанолі)

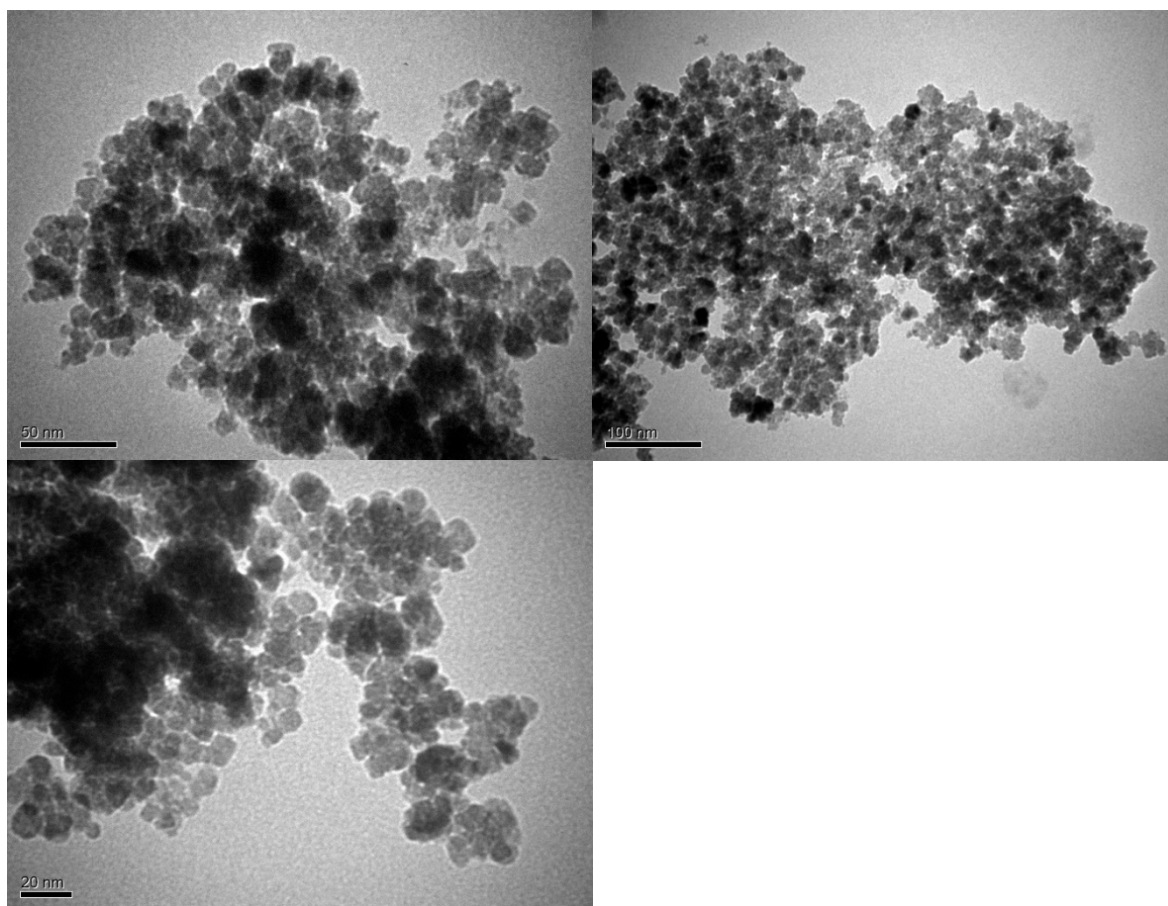


Рис. 3.23 – TEM зразка 2 (*Artemisia tilesii*, листя (контроль) у 70% етанолі)

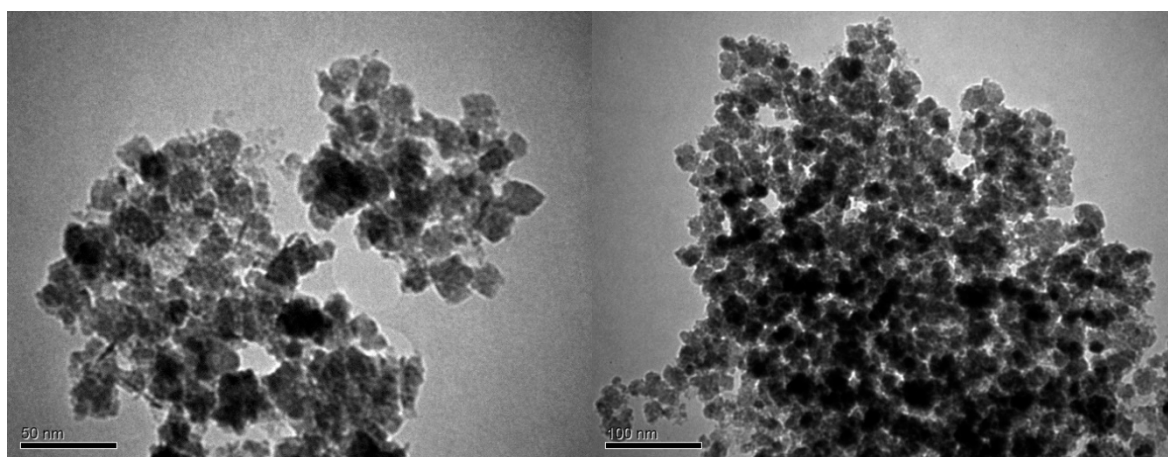


Рис. 3.24 – TEM зразка 3 (*Artemisia tilesii*, трансгенні корені 1-2 у 70% етанолі)

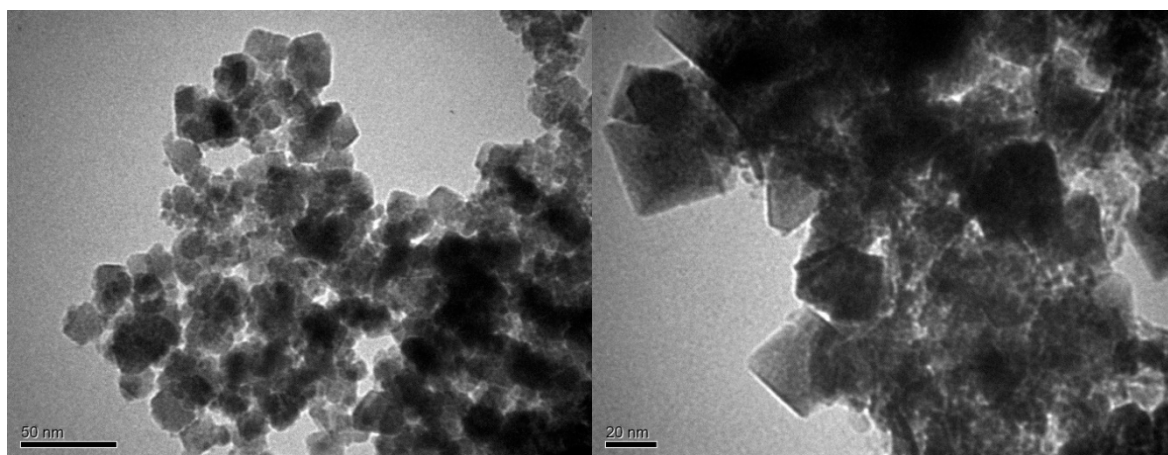


Рис. 3.25 – TEM зразка 4 (*Artemisia tilesii*, трансгенні корені 1-4 у 70% етанолі)

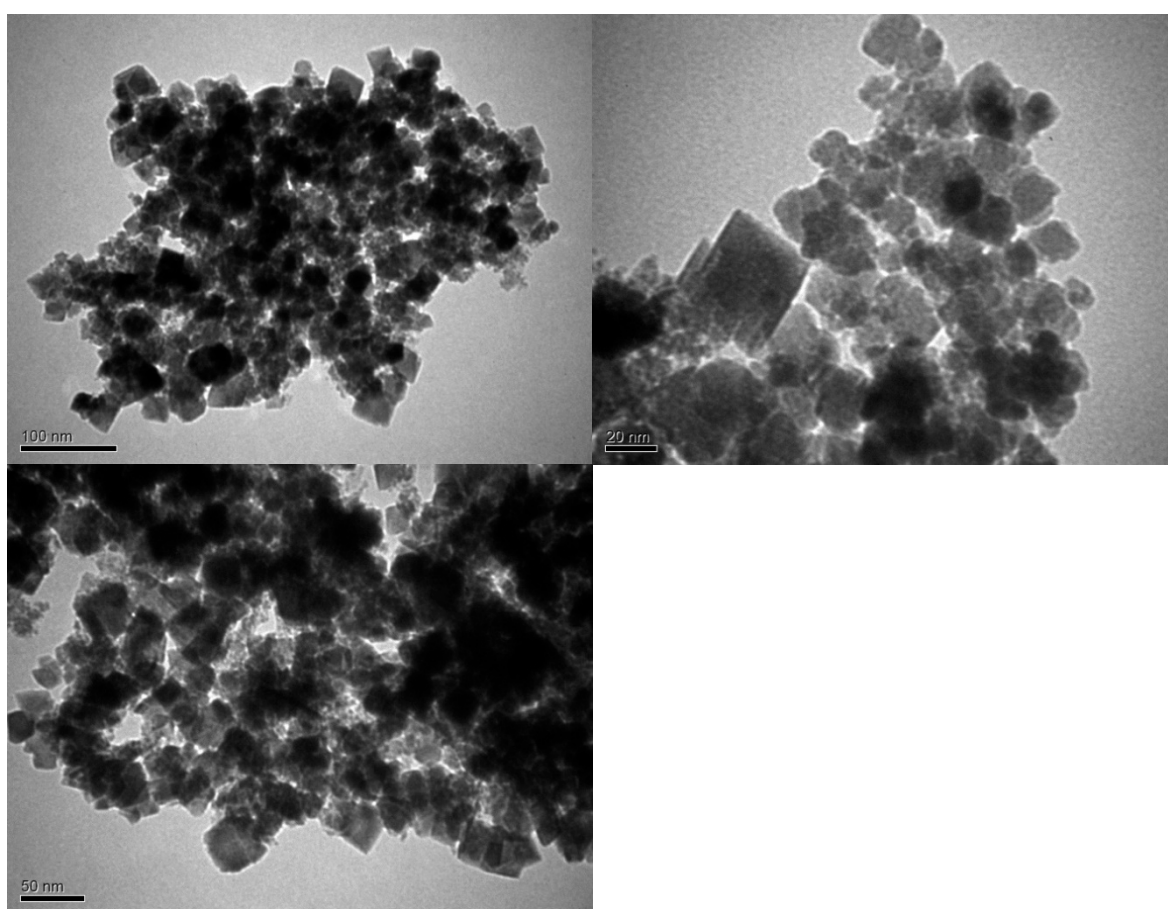


Рис. 3.26 – TEM зразка 5 (*Artemisia tilesii*, трансгенні корені 1-5 у 70% етанолі)

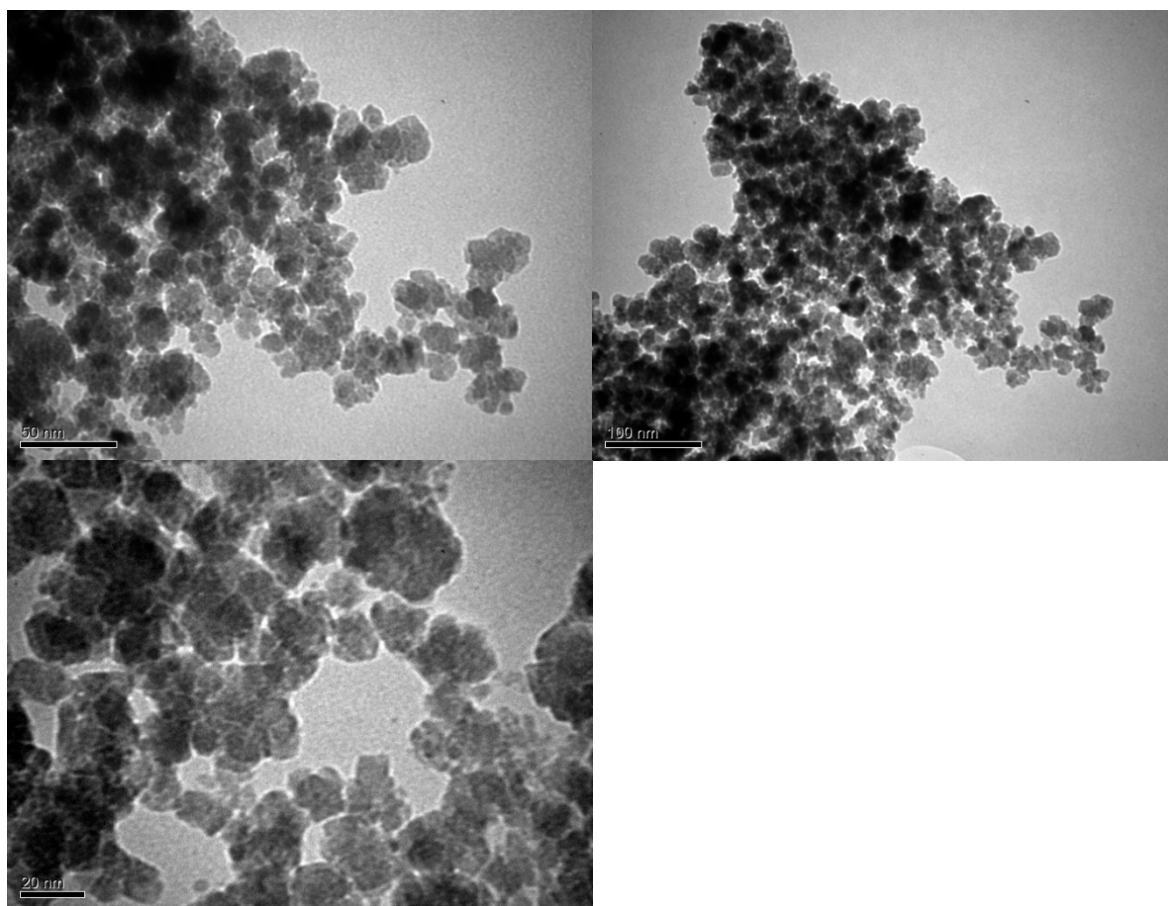


Рис. 3.27 – TEM зразка 6 (*Artemisia tilesii*, трансгенні корені 1-10 у 70% етанолі)

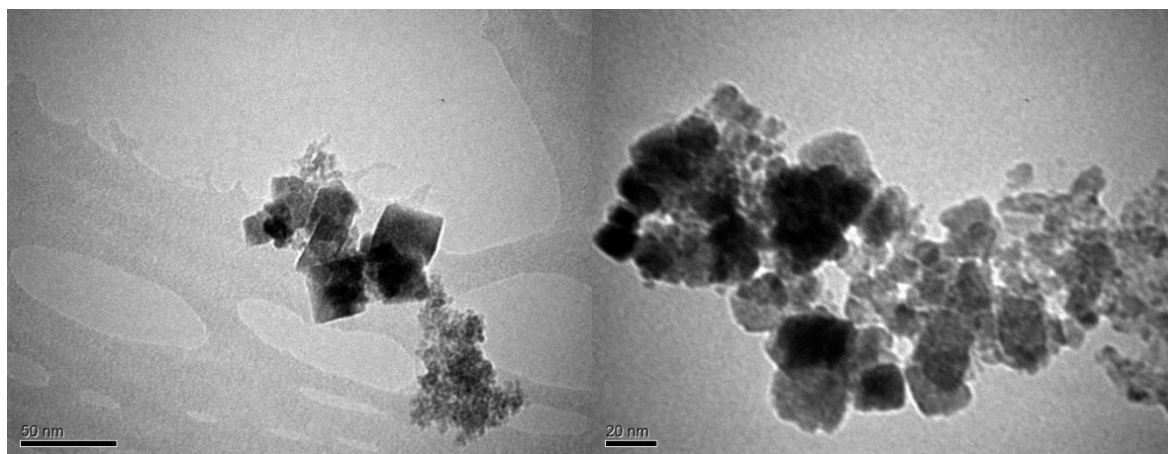


Рис. 3.28 – TEM зразка 7 (*Artemisia tilesii*, трансгенні корені 1-13 у 70% етанолі)

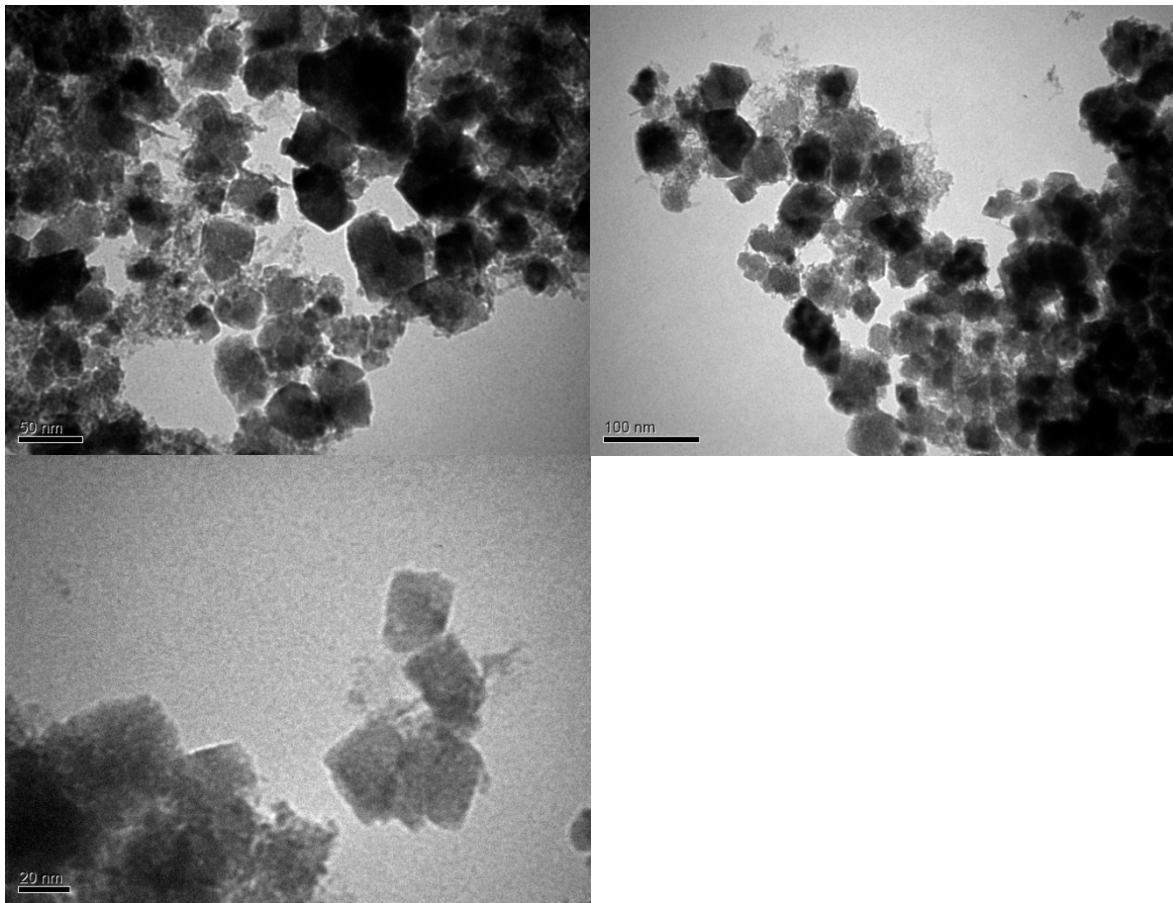


Рис. 3.29 – ТЕМ зразка 8 (*Artemisia tylesii*, трансгенні корені 1-16 у 70% етанолі)

Таким чином було встановлено, що екстракти з нетрансформованих рослин (зразок 1 та 2) можуть бути використані для отримання наночастинок заліза. Разом з тим, використання екстрактів з «бородатих» коренів дозволяє отримати наночастки заліза меншого розміру – від 7 нм.

3.7. Можливість використання FeNPs у сільському господарстві, в якості інгібіторів або стимуляторів росту

Для дослідження впливу наночастинок заліза на ріст рослин, були обрані два сорти салату – «Палла Росса» та «Изумрудный». У кожену чашку Петрі було відібрано по 100 насінин відповідного сорту. Для обробки насіння

використовували попередньо синтезовані наночастки заліза, отримані шляхом згаданим вище (див. розділ 2.5).

Для експерименту чашки Петрі встиляли фільтрувальним папером. У підготовлені чашки рівномірно розміщували попередньо оброблене насіння (див. Табл. 3.1) (обробка проводилась протягом 1 години при кімнатній температурі). Потім до всіх зразків додавалось по 8 мл води, та залишали у спеціальному приміщенні за кімнатної температури та постійним освітленням на 12 днів.

Таблиця 3.1

Склад розчину котрим проводилась попередньо обробка насіння салату

№	Зразок	Склад розчину
1	Палла Росса, Контроль	Попередньо не обробляли
2	Палла Росса	20 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O
3	Палла Росса	100 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O
4	Изумрудный, Контроль	Попередньо не обробляли
5	Изумрудный	20 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O
6	Изумрудный	100 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O

З таблиці 3.2. бачимо, що відсоток насінин, що проросли сорту «ПаллаРосса» збільшилась на 9% після обробки наночастками заліза, а у сорту «Изумрудный» – збільшилось на 3% у випадку обробки розчином з 20 мкл FeNPs + 2 мл H₂O, а в оброблених рослинах розчином 100 мкл FeNPs + 2 мл H₂O бачимо зворотній результат (відсоток насінин, що проросли зменшився на 3% порівняно з контролем).

Можна зробити висновки, що зміна концентрації у різних видів рослин призводить до різних наслідків, і потребує подальшого вивчення.

Таблиця 3.2

Вплив обробки наночастками заліза на проростання насіннєвого матеріалу

№	Зразок	% рослин, що проросли	% рослин, що не проросли
1	Палла Росса, Контроль	64	36
2	Палла Росса, 20 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O	69	31
3	Палла Росса, 100 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O	69	31
4	Изумрудный, Контроль	74	26
5	Изумрудный, 20 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O	76	24
6	Изумрудный, 100 мкл FeNPs + 2 мл H ₂ O	72	28

У результаті дослідження виявлено, що маса контрольних рослин значно нижча ніж у зразків, що попередньо обробили (винятком є зразок 3) (див. Табл. 3.3). Середнє значення маси у контрольних рослин становила $\pm 25,4$ мг та $\pm 20,2$ мг у сорту «Палла Росса» та «Изумрудный» відповідно. Найвищий показник маси був у зразка №2 $\pm 26,5$ мг (що на 4% більше за контроль). Найнижчим – був у контрольного зразка сорту «Изумрудный» і становив $\pm 20,2$ мг.

Таблиця 3.3

Вплив обробки наночастками заліза на масу насіннєвого матеріалу

№	Маса зразків, мг			Середнє значення, мг
	1	2	3	
1	29	22,5	24,6	25,36667
2	26,7	26,9	25,9	26,5
3	26,1	22,4	24,5	24,33333
4	21,3	19,9	19,3	20,16667
5	25,8	22,8	24,4	24,33333
6	23,8	23,4	28,5	25,23333

На Рисунку 1.5. ми бачимо, що збільшення концентрації наночастинок заліза з 20 мкл на 2 мл води на 100 мкл на 2 мл води, інгібувало ріст рослин у сорту «Палла Росса», а у сорта «Изумрудный» навпаки спостерігається незначний приріст маси зі збільшенням концентрації.

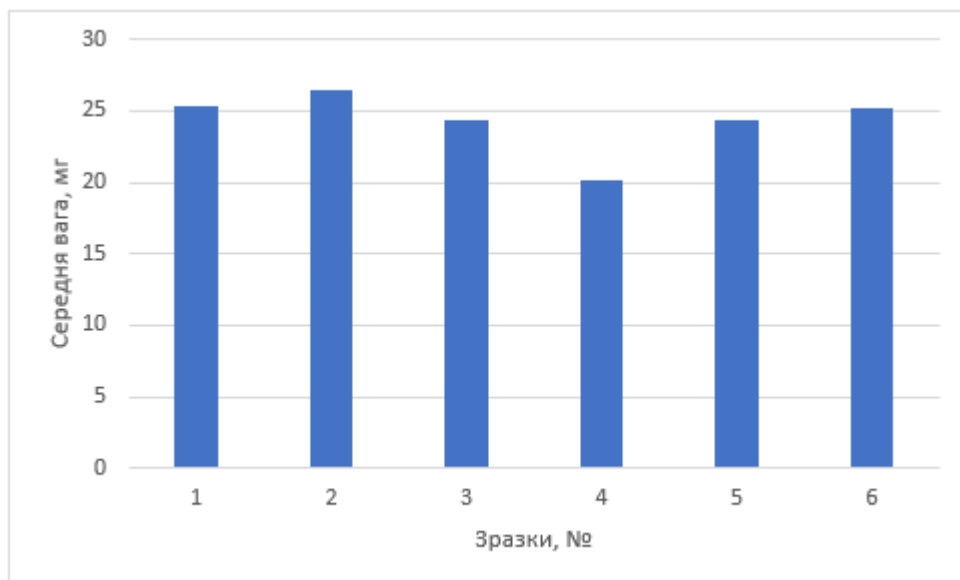


Рис. 3.30 – Вплив обробки насіння наночастками заліза на масу, де зразки № 1-3 – сорт «Палла Росса», зразки № 4-6 – сорт «Изумрудный» (детальніше див. Табл. 3.2)

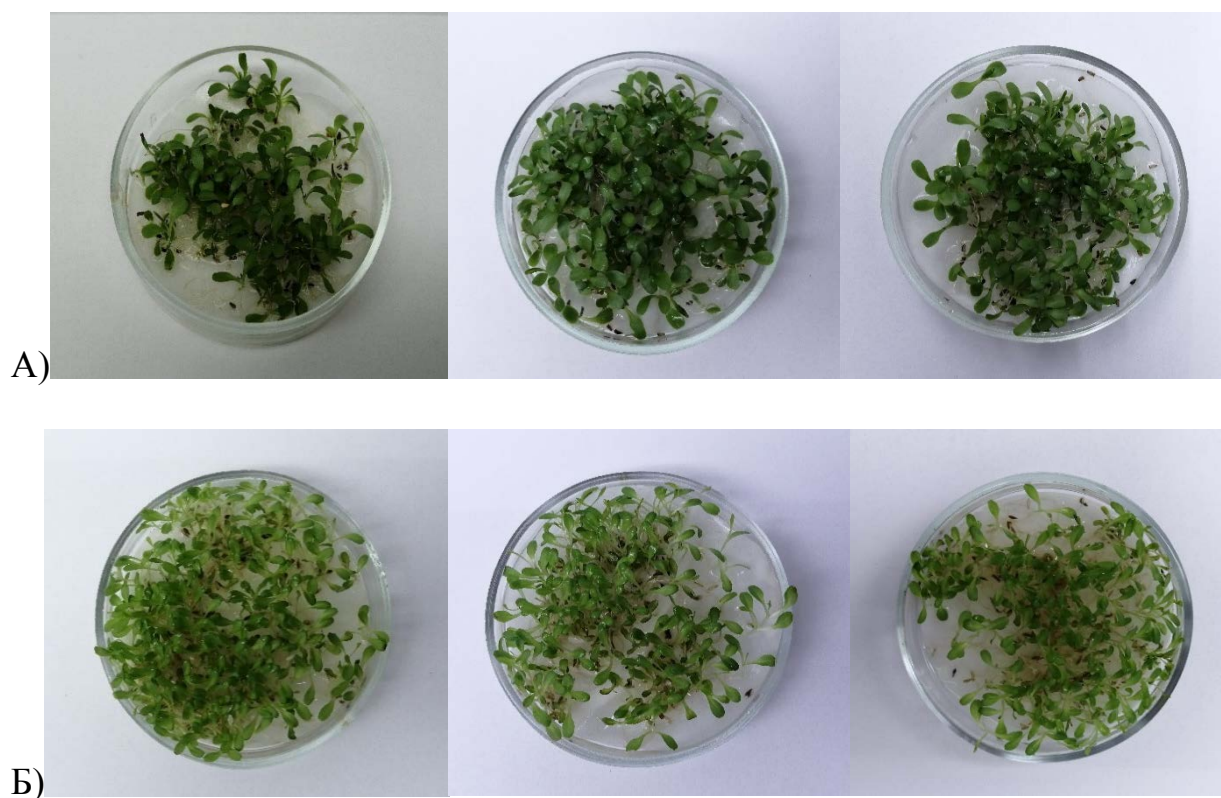


Рис. 3.31 – Насіння салату після 12 днів. А) Зліва на право зразки «Палла Росса» (№ 1-3). Б) Зліва на право зразки сорту «Изумрудный» (№ 4-6).

ВИСНОВКИ

1. Трансформація привела до змін у вмісті флавоноїдів у трансгенних лініях коренів *Artemisia annua*, про що свідчить збільшення вмісту цих сполук майже у 6 разів у зразках №17К, 19К, 20К та А41 у порівнянні зі зразками з контрольних коренів та листків.

2. Досліджені зразки з екстрактів *Artemisia tilesii* на загальний вміст флавоноїдів показали, що вміст флавоноїдів в контрольних рослинах і у трансгенних лініях значно відрізняється. Вміст флавоноїдів в трансгенних лініях значно вищий (винятком є зразки № 4, 6, 7, адже вміст флавоноїдів був значно вищий ніж у контрольних листках, але менший ніж у контрольних коренях), ніж у контрольних рослин.

3. Для екстрактів з «бородатих» коренів з високим вмістом флавоноїдів була характерна більша відновлювальна активність.

4. Склад реакційної суміші впливав на розмір наночасток заліза, що утворювалися. Використання суміші солей, яка складалеться з $\text{FeCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{CoCl}_2$, дозволяє отримати наночастки розміром від 4 нм. У той же час, зміна суміші солей призводить до збільшення розміру наночасток від 8 нм.

5. Екстракти з коренів нетрансформованих рослин *Artemisia annua* та *Artemisia tilesii* (зразки № 1-2 та № 9-10) можуть бути використані для отримання наночасток заліза. Разом з тим, використання екстрактів з «бородатих» коренів дозволяє отримати наночастки заліза меншого розміру – від 2 до 16 нм (*Artemisia annua*), та від 7 нм (*Artemisia tilesii*).

6. Встановлено кореляцію між відновлювальною активністю екстрактів та здатністю утворювати наночастки заліза. Так, у зразках з трансгенних коренів

з високим рівнем такої активності синтез наночастинок відбувався відразу після додавання суміші солі Fe, навіть без доведення рН = 10.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Roco, M. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, V. 14, P. 337–346.
2. Zhang, L. Gu, F. Chan, J. Wang, A. Langer, R. Farokhzad O. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, V. 83, P. 761–780.
3. Daniel, M. Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, V. 104, P. 293–346.
4. Wong, T. Schwaneberg, U. (2003). Protein engineering in bioelectrocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, V. 14, P. 590–596.
5. Ed. Fendler, J. (1998). *Nanoparticles and nanostructured films: Preparation, characterization and applications*. New York: John Wiley & Sons, 463 p.
6. Tsuji, M. Hashimoto, M. Nishizawa, Y. Tsuji, T. (2003). Preparation of gold nanoplates by a microwave-polyol method, *Chem. Lett.*, V. 32, P. 1114–1115.
7. Kundu, S. Maheshwari, V. Saraf, R. (2008). Polyelectrolyte mediated scalable synthesis of highly stable silver nanocubes in less than a minute using microwave irradiation. *Nanotechnology*. V. 19, № 6, 065604.
8. Okitsu, K. Mizukoshi, Y. Yamamoto, T. Maeda, Y. Nagata, Y. (2007). Effect on Nerve Structures of Functionalized Gold-Chitosan Nanoparticles Obtained by One Pot Synthesis. *Lett. Materials.*, V. 61, P. 3429–3431.
9. Narayanan, K. Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, V. 22, № 156, P. 1–13.
10. Gan, P. Ng, S. Huang, Y. Li, S. (2012). Green synthesis of gold nanoparticles using palm oil mill effluent (POME): a low-cost and eco-friendly viable approach. *Bioresour. Technol.*, V. 113, P. 132–135.

11. Raveendran, P. Fu, J. Wallen, S. (2003). "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Am. Chem. Soc.* V. 125, № 46, P. 13940–13941.
12. Sharma, H. Ali, S. Hussain, S. Schlager, J. Sharma, A. (2009). Zelenie nanotehnologii sintez metallicheskih nanochastic s ispolzovaniem rastenii. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, V. 9, № 8, P. 5055–5072.
13. Narayanan, S. Sathy, B. Mony, U. Koyakutty, M. Nair, S. Menon, D. (2012). Biocompatible magnetite/gold nanohybrid contrast agents via green chemistry for MRI and CT bioimaging. *ACS. Appl. Mater. Interfaces*, V. 4, № 1, P. 251–260.
14. Govindaraju, K. Khaleel Basha, S. Ganesh Kumar, V. Singaravelu, G. (2008). Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler, *J. Materials Sci.*, V. 43, P. 5115–5122.
15. Scarano, G. Morelli, E. (2002). Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometals*, V. 15, № 2, P. 145–151.
16. Scarano, G. Morelli, E. (2003). Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in a marine phytoplanktonic alga (*Phaeodactylum tricorutum*, Bohlin) in response to Cd. *Plant Sci.*, V. 165, P. 803–810.
17. Lengke, M. Fleet, M. Southam, G. (2007). Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver(I) nitrate complex. *Langmuir.*, V. 23, № 5, P. 2694–2699.
18. Kowshik, M. Deshmukh, N. Vogel, W. Urban, J. Kulkarni, S. Paknikar, K. (2002). Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. *Biotechnol. Bioeng.*, V. 78, № 5, P. 583–588.
19. Rautaray, D. Ahmad, A. Sastry, M. (2003). Biosynthesis of CaCO₃ crystals of complex morphology using a fungus and an actinomycete. *J. Am. Chem. Soc.*, V. 125, № 48, P. 14656–14657.

20. Anshup, A. Venkataraman, J. Subramaniam, C. Kumar, R. Priya, S. Kumar, T. Omkumar, R. John, A. Pradeep, T. (2005). Growth of gold nanoparticles in human cells. *Langmuir.*, V. 21, № 25, P. 11562–11567.
21. Njagi, E. Huang, H. Stafford, L. Genuino, H. Galindo, H. Collins, J. Hoag, G. Suib, S. (2011). Biosynthesis of iron and silver nanoparticles at room temperature using aqueous sorghum bran extracts. *Langmuir.*, V. 27, № 1, P. 264–271.
22. Dobson, P. King, S. Jarvie, H. (2019). *Nanoparticle*. [online] Encyclopædia Britannica, inc. Available at: <https://www.britannica.com/science/nanoparticle> [Accessed 02 May 2020].
23. Encyclopædia Britannica (2020). *Aquifer*. [online] Encyclopædia Britannica, inc. Available at: <https://www.britannica.com/science/aquifer> [Accessed 02 May 2020].
24. Gong, P. Li, H. He, X. Wang, K. Hu, J. Tan, W. Tan, S. Zhang, X. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, V. 18, P. 604–611,
25. Rai, M. Yadav, A. Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotech. Adv.*, V. 27, P. 76-83.
26. Sharma, V. Ria, A. Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, V. 145, P. 83-96.
27. Baban, D. Seymour, L. (1998). Control of tumour vascular permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, V. 34, P. 109-119.
28. Tomar, A. Garg, G. (2013). Short Review on Application of Gold Nanoparticles. *Global Journal of Pharmacology*, 7(1), P. 34-38.
29. Hasan, S. (2015). A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, V. 4, P. 1-3.
30. Hasany, S. Ahmed, I. Rajan, J. Rehman, A. (2012). Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6), P. 148-158.

31. Jung, J. Oh, H. Noh, H. Ji, J. Kim, S. (2006). Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *J Aerosol Sci.*, V. 37, P. 1662–1670.
32. Iravani, S. Korbekandi, H. Mirmohammadi, S. Zolfaghari B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci.*, 9(6), P. 385–406.
33. Li, X. Xu, H. Chen, Z. Chen G. (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*, P. 1687-4110.
34. Singh, R. Shedbalkar, U. Wadhvani, S. Chopade, B. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), P. 4579–4593.
35. Sastry, M. Ahmad, A. Khan, M. Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.* V. 85, P. 162–170.
36. Mittal, A. Chisti, Y. Banerjee, U. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.*, V. 31, P. 346–356.
37. Kharissova, O. Dias, H. Kharisov, B. Pérez, B. Pérez, V. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol.*, V. 31, P. 240–248.
38. Sharma, V. Yngard, R. Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci.*, V. 145, P. 83–96.
39. Bindhu, M. Umadevi, M. (2013). Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using *Hibiscus cannabinus* leaf extract and its antimicrobial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, V. 101, P. 184–190.
40. Iravani S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, V. 13, P. 2638–2650.
41. Gao, Z. Liu, X. Deng, G. et al. (2016). Fe₃O₄@mSiO₂-FA-CuS-PEG nanocomposites for magnetic resonance imaging and targeted chemophotothermal synergistic therapy of cancer cells. *Dalton Trans.*, V. 45, P. 13456–13465.

42. Sadat, M. Baghbador, M. Dunn, A. et al. (2014). Photoluminescence and photothermal effect of Fe₃O₄ nanoparticles for medical imaging and therapy. *Appl Phys Lett.*, V. 105, P. 1–5.
43. Maleki-Ghaleh, H. Aghaie, E. Nadernezhad, A. et al. (2016). Influence of Fe₃O₄ nanoparticles in hydroxyapatite scaffolds on proliferation of primary human fibroblast cells. *J Mater Eng Perform.*, V. 25, P. 2331–2339.
44. Jiang, P. Zhang, Y. Zhu, C. et al. (2016). Fe₃O₄/BSA particles induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell under static magnetic field. *Acta Biomater.*, V. 46, P. 141–150.
45. Barick, K. Singh, S. Bahadur, D. et al. (2014). Carboxyl decorated Fe₃O₄ nanoparticles for MRI diagnosis and localized hyperthermia. *J Colloid Interface Sci.*, V. 418, P. 120–125.
46. Lin, L. Cong, Z. Cao, J. et al. (2014). Multifunctional Fe₃O₄@polydopamine core–shell nanocomposites for intracellular mRNA detection and imaging-guided photothermal therapy. *ACS Nano.*, V. 8, P. 3876–3883.
47. Wu, W. Wu, Z. Yu, T. et al. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater.*, V. 16, P. 1–43.
48. Sarwat, B. Ghaderi, S. Keshtgar, M. Seifalian, A. (2010). Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging. *Nano Rev.*, V. 1, P. 1–15.
49. Singh, S. Bozhilov, K. Mulchandani, A. et al. (2010). Biologically programmed synthesis of core-shell CdSe/ZnS nanocrystals. *Chem. Commun.*, V. 46, P. 1473-1475.
50. Michalet, X. Pinaud, F. Bentolila, L. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, V. 307, № 5709, P. 538—544.
51. Mahmood, M. Ayman, M. Hamad, A. Hamad, Z. Khan, M. Abdelrahman O. (2018). Green Synthesis of Hydrophobic Magnetite Nanoparticles Coated

- with Plant Extract and Their Application as Petroleum Oil Spill Collectors. *Nanomaterials*, 8(10), P. 855.
52. Dahl, J. Maddux, B. Hutchison, J. (2007). Toward greener nanosynthesis. *Chem. Rev.*, V. 107, P. 2228—2269.
53. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, V. 13, P. 2638—2650.
54. Murashige, T. Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plantarum.*, V. 15, P. 473–497.
55. Pękal, A. Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods.*, V. 7, P. 1776–1782.
56. Zhao, H. Fan, W. Dong, J. Lu, J. Chen, J. et al. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, V. 107, P. 296–304.