

На правах рукописи

Чайка

Чайка Владимир Викторович

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ НАНОЧАСТИЦ НА УСТОЙЧИВОСТЬ
ОРГАНИЗМОВ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ОРГАНИЗАЦИИ С ЦЕЛЬЮ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ И ПОРОГА УСТОЙЧИВОСТИ

Специальность – 1.5.15. – экология (биологические науки)

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:
член-корр. РАО, профессор РАН,
д.б.н. Голохваст К.С.

Петропавловск-Камчатский – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	4
Введение	5
Глава 1. Литературный обзор.....	13
1.1. Наноиндустрия: направления и экологические последствия.....	13
1.2. Влияние наночастиц на живые организмы.....	32
Глава 2. Материалы и методы.....	71
2.1. Используемые частицы и методы изучения их свойств.....	71
2.2. Методы проведения экспериментальных исследований с живыми организмами.....	81
Глава 3. Физико-химические свойства наночастиц, вовлеченных в исследование	108
Глава 4. Ответные реакции организмов на воздействие углеродных наночастиц	121
4.1. Воздействие углеродных наночастиц на одноклеточные организмы.....	121
4.2. Воздействие углеродных наночастиц на беспозвоночных.....	133
4.3. Воздействие углеродных наночастиц на млекопитающих.....	161
Глава 5. Ответные реакции организмов на воздействие наночастиц на основе металлов.....	185
5.1. Воздействие наночастиц на основе металлов на одноклеточные организмы.....	185
5.2. Воздействие наночастиц на основе металлов на беспозвоночных.....	187
5.3. Воздействие наночастиц на основе металлов на млекопитающих.....	194
Глава 6. Ответные реакции организмов на воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц.....	200
6.1. Воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц на одноклеточные организмы.....	200
6.2. Воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц на беспозвоночных.....	204
6.3. Воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц на	

млекопитающих	209
Глава 7. Общие закономерности воздействия наночастиц на организмы с разным уровнем организации и рекомендации к изменению существующих норм и методов контроля, охраны среды и общественного здоровья	213
7.1. Повреждающее действие наночастиц на клеточном уровне и устойчивость одноклеточных организмов.....	213
7.2. Повреждающее действие наночастиц на органно-тканевом и органно-системном уровнях и устойчивость беспозвоночных и млекопитающих.....	217
7.3. Рекомендации к изменению норм и методов контроля, состояния среды и ее охране от новой экологической угрозы.....	242
Выводы.....	244
Список литературы.....	246

Список сокращений и условных обозначений

АФК – активные формы кислорода
БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
НМ – наноматериалы
IL – интерлейкин
ОСУНТ – одностенных углеродных нанотрубок
SOD – супероксид дисмутаза
НЧ – наночастицы
КНТ – кремниевые нанотрубки
МУНТ – многослойные углеродные нанотрубки
МНЧ – магнитные наночастицы
СНЧ – наночастицы серебра
MDA – малоновый диальдегид
FSC – прямое светорассеяние
УНВ – углеродные нановолокна
УНМ – углеродные наноматериалы
УНЛ – углеродные нанолуковицы
УНТ – углеродных нанотрубок
ФНА – флуоресцентный наноалмаз
TNF – фактор некроза опухоли
КТ – квантовые точки
ЛД₅₀ (DL₅₀) – полуметальная доза
ЕС₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация,
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
PI – пропидия йодит
PBS – фосфатно-солевой раствор
САТ – каталаза
LPO (ПОЛ) – перекисное окисление липидов
GPX – глутатионпероксидазы
GST – глутатион-S-трансферазы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В последнее время внимание в научном мире приковано к исследованию наночастиц и развитию нанотехнологий, т.е. технологий направленного получения веществ и материалов с уникальными свойствами в диапазоне размеров до 100 нм (Parisi et al., 2015; Ejima et al., 2017; Хоружая, Джикия, 2018; Barbalinardo et al., 2018; Sharma et al., 2019; Cox et al., 2020; Kubackova et al., 2020; Liu et al., 2020; Soh et al., 2020; Zhao et al., 2020). В настоящее время в мире зарегистрированы и выпускаются промышленностью несколько тысяч наименований наноматериалов (Иншаков, Иншакова, 2017; Arlt et al., 2020; Dimcheva, 2020; Mansas et al., 2020; Rahiminezhad et al., 2020; Sielicki et al., 2020). Оценка объема рынка нанотехнологий в мире различается от агентства к агентству в зависимости от метода подсчета и факторов, взятых в рассмотрение. Так, исследовательское агентство LuxResearch оценивало размер рынка в 2020 г. до 6 трлн дол. США, тогда как BBC Research считало, что к 2021 г. этот рынок вырастет лишь до 90 млрд дол. США. Оба агентства сходятся в своей оценке среднегодовых темпов роста, которые составляют 15–18 % (Диесперова, Заволокина, 2018).

Использование нанотехнологий и наноматериалов бесспорно является одним из самых перспективных направлений науки и техники в XXI в. – веке нанотехнологий (Najabadi et al., 2020). Но вместе с этим первостепенной задачей является изучение вопросов экологии и потенциальных рисков использования наноматериалов (Li, Li, 2020; Natasha et al., 2020; Zeumer et al., 2020). Все наноматериалы, так же как и наночастицы, обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто отличаются от свойств этого же вещества в сплошных фазах или макроскопических дисперсиях (Li et al., 2019).

В настоящее время выделяют несколько десятков видов наноматериалов (НМ). Важнейшей классификацией является градация НМ по количеству измерений в нанодиапазоне. Так, наночастицы имеют все три измерения в нанодиапазоне и могут оказывать крайне негативное воздействие при попадании в окружающую среду (Duester et al., 2016; Wimmer et al., 2019, 2020; Kögel et al., 2020; Paunovic et

al., 2020). Нанотрубки, нановолокна и наностержни имеют два измерения в нанодиапазоне, а нанопластинки и наноленты – по одному. Вторым важным классификационным критерием является структура материала, из которого сделан НМ. В частности, выделяют нанокомпозит, нанопену, нанокристалл и другие типы. И наконец, третьим важным критерием является элемент или химическое соединение, из которого сделан НМ: выделяют минеральные, углеродные, металлические, кремниевые, борные и другие типы.

Вещества наноразмерного уровня могут попасть в окружающую среду разными путями: при производстве, хранении, при обработке и перевозке, использовании, утилизации. Таким образом, помимо положительных и выгодных составляющих нанотехнологий, человек должен задуматься об увеличивающемся количестве вольно или невольно поступающих в окружающую среду наночастиц (Lahir, 2017; Vicho et al., 2020; Lu et al., 2020; Sousa, Ribau Teixeira, 2020). Несмотря на то, что наноматериалы в мире уже используются более 20 лет, ни один вид наноматериалов не был изучен в полном объеме на безопасность ни в одной из стран мира (Tortella et al., 2020). Стоит также отметить, что едва ли не каждый день появляются сообщения о новых типах наноматериалов. В связи с этим в США и ЕС созданы специальные центры по нанобезопасности и лаборатории нанотоксикологии. Первой программой, обратившейся к исследованиям рисков наноматериалов, стала американская «Национальная нанотехнологическая инициатива» (ННИ), принятая в 2000 г. Около 5% ежегодного бюджета ННИ – а это примерно 50–60 млн дол. – выделяется на разработку эффективных методов оценки токсичности наноматериалов и их влияния на окружающую среду и здоровье человека (Lead et al., 2018).

В настоящее время в мире проведено много оригинальных, но разрозненных работ о влиянии НМ на разные группы растений (El-Shazoly, Amro, 2019; Li et al., 2019; Fincheira et al., 2020; Vishwakarma et al., 2020), на бактерии (Maji et al., 2020; Sharma et al., 2020; Talodthaisong et al., 2020) и отдельные таксоны животных: беспозвоночные (Bao et al., 2020a; Boelter et al., 2020; Cimen et al., 2020; Ma et al., 2020; Wang et al., 2020), рыбы (Bao et al., 2020b; Barreto et al., 2020), земноводные (Amaral do et al., 2019; Gebara et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Evariste et al., 2020; Li et al.,

2020) и млекопитающие (Wu, Tang, 2017). Несмотря на это, в изучении экологического действия наночастиц на живые организмы имеется большое количество так называемых «белых пятен». Так, например, практически нет информации о влиянии наноматериалов на птиц и пресмыкающихся, также крайне мало работ по комбинированному действию различных наночастиц (Dabour et al., 2019; García-Gómez et al., 2019; Martín-de-Lucía et al., 2019; Wu et al., 2019; Panov et al., 2020).

Механизмы токсичности и пути биотрансформации наноматериалов в живых организмах также изучены недостаточно. Эти и другие предпосылки легли в основу нашей работы – комплексного исследования влияния НМ на основу экологической устойчивости на планете Земля – на основных участников пищевых цепей.

Объектами настоящего исследования стали живые организмы, обитающие на Дальнем Востоке России.

Предмет исследования: новые загрязняющие вещества – различные по химическому составу наночастицы – и их экотоксикологическое влияние.

Цель работы – определение ответных реакций организмов на клеточном, органно-тканевом, организменном уровнях на воздействие разных типов синтетических и природных наночастиц, выявление пределов их устойчивости для разработки рекомендаций по нормированию экологической опасности.

Для достижения цели было необходимо решить следующие **задачи**:

- 1) Проанализировать микроструктуру и химический состав у изучаемых синтетических и природных наночастиц и на основе полученных характеристик классифицировать их по степени токсичности;
- 2) Определить ответные реакции отдельных видов микроводорослей, позвоночных и беспозвоночных животных на клеточном, тканевом и системно-органном уровнях на воздействие разных концентраций и экспозиции многослойных углеродных нанотрубок и нановолокон;
- 3) Определить ответные реакции отдельных видов микроводорослей, позвоночных и беспозвоночных животных на клеточном, тканевом и системно-органном уровнях на воздействие разных концентраций и экспозиции наночастиц на основе металлов;

4) Определить ответные реакции отдельных видов микроводорослей, позвоночных и беспозвоночных животных на клеточном, тканевом и системно-органном уровнях на воздействие разных концентраций и экспозиции минеральных наночастиц;

5) Провести сравнительный анализ разного по времени и степени воздействия на представителей изученных видов разных типов наночастиц и изучить их биотрансформацию;

6) Проанализировать изменения состояния нервной, пищеварительной, выделительной системы у млекопитающих и нарушения эмбриогенеза беспозвоночных под воздействием наночастиц;

7) С учетом данных проведенного исследования подготовить предложения для органов государственного контроля за состоянием окружающей среды и ее загрязнением разными типами наночастиц.

Научная новизна. Впервые с использованием единой приборно-аналитической базы, едиными методами исследования изучены ответные реакции 16-ти далеких по таксономическому положению видов на воздействие нанозагрязнения.

Показано, что вне зависимости от уровня организации организмов и строения их клеток из изученных загрязнителей наиболее токсичными являются частицы на основе металлов CdS, ZnS.

Показано, что чем ниже уровень организации организма, тем сильнее выражен токсический эффект воздействия на него всех изученных типов наночастиц. На примере микроводорослей и отдельных групп беспозвоночных показана видоспецифичность ответных реакций организмов на нанозагрязнение.

Впервые было изучена кинетика наночастиц в водной среде и показано, что они гораздо дольше, чем в атмосфере, сохраняют свою токсическую активность.

Впервые выявлено, что в кишечнике насекомых может протекать биотрансформация углеродных наночастиц.

Показано, что при концентрации углеродных наночастиц 500 мг/кг у лабораторных крыс повышается тревожность и понижается поисковая активность, заметно ухудшается состояние пищеварительной и выделительной систем.

Теоретическое и практическое значение работы. Проведенное исследование закладывает методологические основы для изучения комплексного воздействия наночастиц на организмы разных трофических уровней, что дает возможность прогнозировать (при накоплении подобных сведений по другим таксономическим группам организмов) изменение состояние сообществ под воздействием нанозагрязнений. Полученные практические результаты могут быть использованы при проведении гигиенического мониторинга нанозагрязнения окружающей среды, для изменения требований санитарно-гигиенических норм и учета уровня нанозагрязнения, а также разработки предложений по пересмотру границ санитарно-защитных зон предприятий нанотехнологической отрасли. Результаты исследований могут использоваться в учебных программах для студентов биологических и медицинских специальностей.

Методология и методы диссертационного исследования.

В основе методологии исследования лежит системный подход. Система при этом рассматривается как множество взаимосвязанных элементов, образующих определенную целостность. Воздействие наночастиц на разные биологические виды проводили на высокоточном наукоемком оборудовании с использованием лабораторных культур одноклеточных организмов, эмбрионов беспозвоночных, гемоцитов двустворчатых моллюсков и лабораторных животных линии Вистар для крыс и СВА для мышей. В работе были использованы стандартные методы лабораторных исследований, позволяющие изучить влияние разных типов наночастиц на функционирование клеток, тканей, органов и организма в целом. Они позволили установить ответные реакции организмов на нанозагрязнение и степень опасности частиц, обусловленный их размерами, структурой и химическим составом.

Методология исследования базируется на фундаментальных и прикладных работах, посвященных изучению токсичности НМ, физико-химические свойства НМ, процессы их генезиса и переноса (Lademann et al., 1999; Brown et al., 2001; Worm, 2002; Shvedova et al., 2003, 2005; Maynard et al., 2004; Остроумов и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Гусев и др., 2010а; Маторин и др., 2010; Остроумов, Колесов, 2010; Халиуллин и др., 2013; Pikula et al., 2019, 2020).

Было проведено исследование наиболее часто применяемых в современной промышленности НМ: углеродных, минеральных, кремниевых, металлических, а также квантовых точек. Проведен комплексный анализ химико-физических основ токсичности НМ, чтобы более точно прогнозировать и анализировать последствия их влияния на окружающую среду.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наноматериалы проявляют отрицательное экологическое действие на клеточном, организменном и популяционном уровне, вызывая токсические эффекты на отдельные клетки, органы и системы организма, вплоть до высших интегральных характеристик высшей нервной деятельности (поведение и когнитивные показатели).

2. Организмы, обитающие в водной среде, насыщенной взвешенными ультрадисперсными частицами, обладают большей устойчивостью к воздействию наночастиц, чем наземные организмы, ввиду эволюционных адаптаций.

3. Летальные дозы всех изученных нанозагрязнителей возрастают в направлении: микроводоросли → иглокожие → моллюски → членистоногие → млекопитающие → человек. Это свидетельствует о том, что повышение уровня сложности организма обеспечивает повышение уровня их устойчивости к токсическому воздействию.

4. Санитарно-гигиеническая опасность наночастиц обусловлена их высокой проникающей способностью в клетки и органы, длительностью периода токсической активности, крайне слабой биотрансформацией, накоплением в окружающей среде и способностью перемещаться по звеньям пищевых цепей.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена использованием стандартизированных методов исследования, использованием чистых лабораторных культур, линий лабораторных животных, многократной повторностью экспериментов использованием поверенных приборов, использованием высокоточного оборудования по лазерной гранулометрии, рамановской спектроскопии, сканирующей оптической, лазерной конфокальной и электронной микроскопии, методов рентгеновских исследований, дзета-потенциометрии, проточной цитометрии, иммуногистохимии.

Личный вклад автора. Автор на всех этапах работы принимал личное участие в определении задач исследований, постановке экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов. Значительную часть экспериментов и наблюдений он провел лично. Им проведена вся статистическая обработка количественных данных, выполнены микрофотографии на световом и лазерном конфокальном микроскопе. Автор принимал непосредственное участие в подготовке всех публикаций по теме диссертации.

Апробация результатов. Результаты, представленные в диссертационной работе, докладывались на III Конференции Общества клеточной биологии (16–18 октября 2012, Санкт-Петербург); III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (22–24 ноября 2012, Казань); Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов», посвященной памяти член-корр. АМН СССР профессора Ф.М. Лазаренко (2013, Оренбург); XVIII International Congress on Rehabilitation in Medicine and Immunorehabilitation and the VI World Asthma; Allergy & COPD Forum (London, UK, April 27–30, 2013); Объединенном иммунологическом форуме (30 июня – 5 июля 2013, Нижний Новгород); VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (21 марта 2013, Москва); International Conference on Agricultural and Biosystem Engineering (July 7–8, 2014, Beijing, China); International Conference on Photonics of Nano- and Micro-Structures (June 19–20, 2015, Tomsk); 52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) (September 4–7, 2016, Seville, Spain); международной научно-практической конференции «Эколого-биологическое благополучие растительного и животного мира» (18–19 октября 2017, Благовещенск); молодежной секции 12-й Российско-Германской сырьевой конференции (27–29 ноября, 2019, Санкт-Петербург).

Публикации. По материалам диссертации получено 2 патента РФ, опубликовано 41 научных работ, включая 2 коллективные монографии, 19 статьи в изданиях,

рекомендованных ВАК, и 20 в зарубежных журналах, индексируемых БД Scopus (идентификатор автора в Scopus: 56962786100).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 289 страниц, включает список сокращений и условных обозначений, введение, 7 глав, в которых изложены результаты исследований и их обсуждение, выводы и список использованной литературы. Последний включает 430 источника, в том числе 377 иностранных. Диссертация иллюстрирована 46 таблицами и 109 рисунками.

Благодарности. Выражаю благодарность своему научному консультанту члену-корреспонденту РАО, профессору РАН К.С. Голохвасту за всестороннюю поддержку на всех этапах проведения исследований и оформления результатов.

Я искренне благодарен за длительное плодотворное сотрудничество коллегам и соавторам, сотрудникам ДВФУ: к.х.н. А.М. Захаренко, к.б.н. В.В. Чернышеву, к.б.н. К.С. Пикуле, к.б.н. А.А. Анисимовой, к.б.н. И.А. Кирсановой, проф., д.м.н. Г.В. Реве, проф., д.т.н. А.И. Агошкову, инженеру НОЦ А.С. Смирнову.

Огромная признательность сотрудникам ННЦМБ им. А.В. Жирмунского к.б.н. Т.Ю. Орловой, к.б.н. Ж.В. Маркиной за консультации по культивированию микроводорослей.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Наноиндустрия: направления и экологические последствия

В мире современных технологий появляется много новых материалов, но наибольший рост наблюдается среди наноматериалов: нановолокна, нанотрубки, наношарики, наностержни, квантовые точки, иммобилизированные наночастицы и еще ряд экзотических структур. Большинство наноматериалов имеет углеродную природу, но есть металлические, силикатные, целлюлозные и иные структуры. Растет объем их присутствия в жизни человека и окружающей среде, так как из лабораторных образцов, получаемых в микрограммовых количествах, они вырастают в многотонные производства. Наиболее изучены токсические свойства углеродных наноматериалов, и, в частности, нанотрубок – одно- или многослойных цилиндрических структур, состоящих из углерода диаметром до нескольких десятков нанометров и длиной до нескольких сантиметров.

В XXI в. контакт человека с наночастицами становится все заметнее (Абаева и др., 2010; Zhu et al., 2019), но недостаток знаний в области безопасности применения и токсичности наноматериалов может стоить человечеству дорого. Показано, что наночастицы не распознаются защитными системами организма, что приводит к их накоплению в растениях и животных организмах, а значит, увеличивается потенциальная возможность поступления наночастиц в организм человека, при этом негативное влияние может иметь и отсроченный характер (Латышевская, Стрекалова, 2011; Arora et al., 2012).

Сообщения о токсичности нанотрубок в мировой литературе начали появляться сравнительно недавно (с начала 2000-х гг.), но поиск в данном направлении продолжается до сих пор (Shvedova et al., 2012). Большинство исследователей сходится во мнении, что углеродные нанотрубки достаточно токсичны, вызывают апоптоз клеток и проявляют мутагенные свойства вследствие усиления образования активных форм кислорода. В ряде публикаций показана биodeградация нанотрубок (Kotchey et al., 2012; Shvedova et al., 2012; Kagan et al., 2014).

В июне 2004 г. в Александрии (США) эксперты из 25 стран мира собрались для неформального обсуждения возможной координации исследований нанорисков. В 2005 г. была утверждена европейская Стратегия в области нанотехнологий. Ранее Европейская комиссия одобрила «принцип предосторожности» в применении к нанотехнологиям. Он подразумевает разработку общих представлений о том, как оценивать риски и управлять ими в случае, когда наука не располагает достоверными и исчерпывающими знаниями в рассматриваемой области. В 2008 г. в ЕС был одобрен «Свод правил по ответственным и безопасным исследованиям в нанонауках и нанотехнологиях» («Code of conduct for Responsible Nanosciences and Nanotechnologies Research»). В 2008 г. учреждена Международная нанотоксикологическая организация (International Alliance for NanoEHS Harmonization). При Химическом комитете ОЭСР (Организация экономического сотрудничества и развития) создана рабочая группа по промышленным наноматериалам (Working Party of Manufactured Nanomaterials, WPMN). Ее цель — содействие решению вопросов безопасности наноматериалов для здоровья человека и окружающей среды. По итогам первого совещания рабочей группы (Лондон, октябрь 2006 г.) была принята межгосударственная программа по выявлению потенциальных рисков наноматериалов. Активные участники программы — США, Япония, Великобритания, Германия, Китай.

Возможна международная специализация стран-участников ОЭСР:

- США – токсичность НМ, загрязнение окружающей среды, проблема терроризма с использованием нанопродуктов;
- Япония – токсичность НМ;
- Великобритания – разработка стандартов безопасности НМ.

Исследования нанотоксикологии и мероприятий по созданию системы безопасности при работе с НМ у нас в стране (по примеру развитых стран) не должны отставать от широкого внедрения нанотехнологий в производство, а первоочередной задачей должна стать разработка базы стандартов безопасности НМ и нанопроизводств. В США на решение вопросов медико-санитарного сопровождения работ в области нанотехнологий необходимо выделять не менее 10 % от всего бюджета

средств, направленных на развитие наноиндустрии. Аналогичный процесс (с некоторым отставанием) идет и в России. Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов утверждена Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 79 от 31.10.2007.

В Российской Федерации не разработаны ГОСТы или СанПиН, устанавливающие предельно допустимые концентрации наночастиц (Абаева и др., 2010), на территории страны действуют лишь ГН 1.2.2633-10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды» (ГН 1.2.2633-10), утвержденные в 2010 г. Но они лишь частично касаются проблем влияния наночастиц на окружающую среду и нормируют только содержание наночастиц диоксида титана, серебра и одностенных углеродных нанотрубок (ОСУНТ). Очевидно, что этот список должен быть дополнен двух- и многослойными углеродными нанотрубками, углеродными нановолокнами, углеродными нанополлимерами, графеновыми квантовыми точками и нанолентами, кремниевыми, борными и титановыми нанотрубками и многими другими типами НМ. В Дубне к 2015 г. должен был быть создан Центр доклинических исследований наномедицинских препаратов, но проект, к сожалению, был закрыт ОАО Роснано (ранее – ГК Роснано) в 2012 г.

В настоящее время на наноразмерные частицы возлагаются большие надежды ученых не только технических наук, но и медико-биологических направлений. Число публикаций, посвященных нанотехнологиям, неуклонно увеличивается, превысив по данным базы данных Scopus уже 250 тыс., при этом все чаще встречаются статьи, освещающие способы применения НМ в медицинской практике (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Арчаков, 2010; Гусев и др., 2010; Ивонин и др., 2012). Несомненно, причиной повышенного внимания к наночастицам являются их уникальные свойства (Engin et al., 2017).

Бесспорно, одним из важнейших свойств для медицины и фармакологии является уникальная способность наночастиц проникать через клеточную мембрану (Гусев и др., 2013) и преодолевать гематоэнцефалический барьер (Величковский, 2009;

Абаева и др., 2010). Хотя ряд авторов (Фатхутдинова и др., 2009) отмечают, что при инъекционном введении гидроксिलированных одностенных углеродных нанотрубок мышам они распределялись по всем органам, кроме головного мозга. Все чаще исследователи указывают, что углеродные наночастицы являются одними из самых известных и распространенных наноструктур (Зиганшин, Зиганшина, 2009; Абаева и др., 2010; Голохваст и др., 2010; Митрофанова и др., 2014). Но недостаток знаний о биосовместимости и цитотоксичности углеродных нанотрубок еще ощутим, и это не может не тормозить возможность их применения в медицинской практике (Митрофанова и др., 2014), а поэтому вопрос токсичности углеродных нанотрубок является одним из главных на сегодняшний день.

Опыт исследования других веществ (молекул и более крупных частиц) учил нас тому, что механизмы генотоксических эффектов могут быть разнообразными, в то время как часто возникает необходимость оценить генотоксическую опасность. Таким образом, практический и прагматичный подход заключается в использовании набора стандартных методов тестирования генотоксичности, охватывающего широкий спектр механизмов. Применение этих стандартных методов к наноматериалам требует, однако, нескольких адаптаций и интерпретации результатов испытаний на генотоксичность, возможно, потребуются дополнительные исследования (Landsiedel et al., 2009).

Немаловажным и до сих пор открытым является вопрос о степени мутагенности нанотрубок, что отражено в целом ряде публикаций. Так, отмечается, что «без сомнений, наночастицы взаимодействуют с ДНК и, таким образом, вмешиваются в генетические процессы организма» (Каркищенко, 2009, С. 16). Помимо собственной токсичности, наночастицы могут адсорбировать различные химические соединения. В частности, в исследовании Диаза с соавторами (Diaz et al., 2007) оценивалась адсорбция различных алканов (линейных и циклических), ароматических соединений и хлоруглеводородов с различными углеродными наночастицами: углеродные нанотрубки, нановолокна, графит с высокой удельной поверхностью. Среди различных протести-

рованных адсорбатов бензол обладает наибольшей адсорбционной способностью. Адсорбционные параметры коррелировали с морфологическими и химическими свойствами материалов (Ren et al., 2011; Patiño et al., 2015).

Наблюдается, что биологическая устойчивость нанотрубок зависит от химии функционализации их поверхности. Однослойные нанотрубки с карбоксилированными поверхностями уникальны по своей способности подвергаться 90-дневной деградации фаголизосомным имитатором. Немодифицированные, озонообработанные и арилсульфированные трубки в этих условиях не деградируют. Мы объясняем разницу уникальной химией карбоксилирования кислотой, которая не только вводит поверхностные группы COOH, но также вызывает сопутствующее повреждение трубчатой графенной цепи в виде соседних активных центров, которые обеспечивают точки атаки для дальнейшей окислительной деградации. Эти результаты свидетельствуют о стратегическом использовании поверхностного карбоксилирования в нанотрубках, где биodeградация может повысить безопасность (Liu et al., 2010).

При биотестировании углеродного наноматериала (УНМ) «Таунит» с использованием бактерий и гидробионтов выяснилось, что по принятой шкале в экотоксикологии материал может быть отнесен к 3–4-му классу опасности (Гусев и др., 2010а; Рыбалкин и др., 2013). Но в другом источнике утверждают, что материал может быть отнесен к умеренно опасным веществам, и автор пишет, что прямой контакт с нанотрубками может привести к повреждению клеточных мембран и вызывать гибель бактерий *Escherichia coli* (Гусев и др., 2013).

Прежде чем прибегать к помощи наночастиц в медико-биологической практике, необходимо просчитывать все возможные риски. Для этого в токсикологии появляется новое направление – нанотоксикология, признанная изучать токсичность наноматериалов при взаимодействии с живыми организмами. В токсикологическом плане самыми вероятными и более частыми путями попадания наночастиц в организм являются ингаляционный и через желудочно-кишечный тракт (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Халлиулин и др., 2013).

Л.Ф. Абаева с соавторами (2010) указывают перспективные направления применения нанотехнологий в медицине, к ним, в частности, относятся диагностика заболеваний на ранних стадиях и методы адресной доставки лекарственных препаратов к пораженным клеткам. По эффективности и минимальной токсичности такие методы сравниваются с «точечным бомбовым ударом» (Ивонин и др., 2012).

Академик РАН А.И. Арчаков (2010) видит преимущества лекарственных препаратов в виде наночастиц в их высокой скорости растворения, повышенной биодоступности, быстром эффекте и снижении рисков побочных эффектов. Многие исследователи согласны, что такой метод доставки лекарственных препаратов является перспективным направлением в фармакологии (Сейфулла и др., 2008; Гусев и др., 2010а; Бородкин, 2011; Латышевская, Стрекалова, 2011; Ивонин и др., 2012; Митрофанова и др., 2014; Постнов и др., 2013).

В будущем такой метод может стать перспективным и в лечении нейродегенеративных заболеваний. Г.И. Бородкин (2011) сообщает об исследовании по введению углеродных нанотрубок с пиридиновыми остатками в культуру нервных клеток человека. Оказалось, что эффективность передачи нервного импульса в модифицированной культуре значительно увеличивается. Адресная доставка лекарственных препаратов призвана стать альтернативным методом в лечении также нейроинфекций и онкозаболеваний, когда необходимо применять достаточно токсичные препараты для здоровых тканей (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Ивонин и др., 2012).

Появляются исследования применения нанотрубок в онкологии, в частности влияние углеродных нанотрубок на опухолевые структуры. Так, интрамуральное введение в лимфосаркому Плисса одностенных углеродных нанотрубок с NH_2 -группами (NT-NH_2) приводило к торможению опухолевого роста в течение 3 нед. и увеличивало продолжительность жизни животных (Кит и др., 2013), а в опытах на клеточных культурах нормальной микроглии и глиомы с добавленными в среду инкубации нанотрубками показано, что углеродные нанотрубки не оказывают токсического эффекта и успешно поглощаются опухолевыми клетками (Саркисян и др., 2014).

Исследователи также выделяют и другие перспективные направления применения нанотехнологий в медицине: создание методов борьбы со старостью (Бородкин, 2011; Муртазина, Лефтерова, 2012), решение проблемы бессмертия человека (Бородкин, 2011), наноразмерная генетическая терапия и наноразмерная контролируемая терапия стволовыми клетками (Муртазина, Лефтерова, 2012). Становится очевидным, что информации по влиянию углеродных наноматериалов, в частности нанотрубок на морфологические, физиологические характеристики в живом организме, недостаточно, а иногда такая информация является противоречивой. Но, как известно, живые организмы адаптируются к изменчивым факторам среды не только за счет корректировки биохимических, морфологических показателей, но и посредством адаптивных поведенческих механизмов (Голохваст и др., 2010).

Если говорить о влиянии углеродных нанотрубок на высшую нервную деятельность, и поведение в частности, то информации практически нет. Так, (А.А. Гусев и др. 2010) немного затрагивают данную проблему, описывая, что при изучении влияния данного углеродного материала на репродуктивную систему мышей самцы контрольной и экспериментальных групп проявляли адекватное половое поведение. (В.В. Поляков и др. 2008) считают, что нанотехнологии могут влиять на умственные возможности, а другая форма углеродного наноматериала – фуллеренол – нормализует поведенческие реакции и устраняет явления энцефалопатии.

Механизмы поступления, распределения и выведения многообразны для разных наночастиц и требуют внимания к их изучению и биологическому воздействию на органы человека. Для активного внедрения наноматериалов в клиническую медицину необходимо глубокое знание потенциальных рисков и побочных эффектов, сопряженных с использованием этих материалов. Производственные циклы, направленные на создание новых наноматериалов, также могут сопровождаться накоплением отходов, оказывающих токсическое, канцерогенное и мутагенное действие на организм человека. В связи с этим в специальной литературе последних лет большое внимание уделяется рассмотрению вопросов безопасности наноматериалов и нанотехнологии в медицине и биологии. Отрасль исследований,

связанных с изучением безопасности наноматериалов, получила название нанотоксикология (Donaldson et al., 2004). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что наночастицы TiO_2 индуцируют генотоксичность, главным образом посредством генерирования окислительного стресса в клетках. Генерация активных форм кислорода зависит от размера, структуры и агрегации наночастиц TiO_2 . Окислительный стресс, создаваемый наночастицами, может влиять на восстановление ДНК, пролиферацию клеток и апоптоз, влияя на структуру белка (Chen et al., 2014).

Поступление наночастиц в организм человека возможно ингаляционным, пероральным, перкутаным и парентеральным (в случае введения лекарственных и диагностических агентов, конъюгированных с наночастицами) путями. Контакт человека с наноматериалами может происходить на этапе разработки, производства, использования и переработки (Thomas, 1992; Stern, McNeil, 2008).

За счет броуновского движения наночастицы способны преодолевать большие расстояния в воздушной среде и, следовательно, с легкостью проникают в альвеолы легких. Установлено, что многие наночастицы, находящиеся в воздухе, имеют ярко выраженную тенденцию к спонтанной агрегации и формированию более крупных частиц (Delfino et al., 2005). Агрегация воздушных наночастиц может также наступать в результате конденсации на них паров воды. По мере увеличения размера наночастиц вероятность их проникновения в альвеолы снижается. В то же время агрегация воздушных наночастиц с их укрупнением создает предпосылки для их контактирования с кожей и желудочно-кишечным трактом. С другой стороны, создание искусственных покрытий из наночастиц (например, с помощью полиэтиленгликоля), предназначенных для уменьшения взаимодействия между частицами, напротив, препятствует агрегации воздушных наночастиц и делает их попадание в нижние дыхательные пути более вероятным.

Наночастицы, обладая более высокой токсичностью по сравнению с обычными микрочастицами, способны проникать в неизменном виде через клеточные барьеры, а также через барьер из клеток головного мозга в центральную нервную систему, циркулировать и накапливаться в органах и тканях, вызывая более выра-

женные патоморфологические поражения внутренних органов, а также имеют длительный период полувыведения. Японские ученые (Yamamoto et al., 2004) в своих исследованиях указывают на то, что токсичность наночастиц определяется не только их размером, но и формой. Наночастицы дендритной и веретенообразной формы обладают более высокой цитотоксичностью, чем частицы сферической формы. Основными органами-мишенями для наночастиц являются легкие, печень, почки, головной мозг, желудочно-кишечный тракт. Прослеживается зависимость органов-мишеней от пути поступления. При воздействии наночастиц на организм человека возможно развитие оксидативного стресса, ингаляционной/трансдермальной ассимиляции, астмы, хронических обструктивных болезней легких, злокачественных новообразований, нейродегенеративных заболеваний, нарушений со стороны сердечно-сосудистой системы и сердечной деятельности, нарушение генома клетки (репликации ДНК).

В нескольких экспериментальных исследованиях, выполненных на грызунах, была показана транслокация наночастиц из просвета альвеол в интерстиций легких (Oberdörster et al., 2000). Такого рода перенос вдыхаемых наночастиц в легкие и затем в кровь заслуживает особенного внимания, поскольку в некоторых исследованиях была показана роль вдыхаемых наночастиц в патогенезе различных заболеваний. Например, в одной работе (Radomski et al., 2005) авторы показали, что углеродные нанотрубки усиливают агрегацию тромбоцитов *in vitro* и стимулируют процесс тромбообразования *in vivo*.

Результаты исследований, посвященных вопросу транслокации вдыхаемых наночастиц из легких в другие органы, носят противоречивый характер. Так, например, авторы одного исследования (Kreyling et al., 2002) установили, что у крыс транслокации из легких в печень, селезенку, сердце и мозг подвергается не более 1 % иридиевых наночастиц, имевших диаметр 80 и 15 нм. С другой стороны, у людей не наблюдалось поступления углеродных наночастиц, меченных технецием-99, из легких в другие органы (Brown et al., 1999). В целом имеющиеся данные позволяют считать, что легкие представляют собой труднопреодолимый барьер для проникновения наночастиц в организм.

В некоторых экспериментальных исследованиях на крысах была показана способность вдыхаемых наночастиц поступать через эпителий носоглотки и обонятельную луковицу в центральную нервную систему (Elder, Chen, 2006). Результаты этих исследований, по-видимому, не подлежат прямому переносу на аналогичную ситуацию у человека. Это связано с тем, что крысы имеют значительно большую площадь обонятельного эпителия, а относительная масса их обонятельной луковицы в 177 раз больше, чем у человека. Тем не менее в некоторых клинических исследованиях был обнаружен захват нейронами обонятельной луковицы человека вводимых интраназально наночастиц золота диаметром 50 нм (Nadol et al., 1970). Кроме того, хорошо известен факт миграции по нервным путям некоторых наноразмерных вирусов. Таким образом, транслокация вдыхаемых с воздухом наночастиц в нейроны ЦНС представляется весьма вероятной. Эти данные вызывают особенную настороженность, поскольку в одном из последних исследований было показано, что магниевые наночастицы обладают выраженной нейротоксичностью, вызывая оксидативный стресс, истощение внутриклеточных запасов дофамина и гибель нейронов (Hussain et al., 2006).

Наночастицы могут поступать в организм человека через кожу. Усиление интереса к перкутанному пути поступления наночастиц связано с активным использованием нанотехнологии в производстве одежды, косметических средств и солнцезащитных кремов. Изучению вопроса о проникновении наночастиц оксида титана (10–60 нм), входящих в состав солнцезащитных кремов в качестве поглотителей ультрафиолетового излучения, в эпидермис человека и животных был посвящен целый ряд исследований (Gamer et al., 2006; Mavon et al., 2007). В этих исследованиях не было зафиксировано проникновение наночастиц оксида титана глубже рогового слоя эпидермиса, хотя в некоторых случаях отмечалось избирательное накопление наночастиц в волосяных фолликулах (Nohynek et al., 2007). С другой стороны, в последнее время были получены данные о хорошей проникающей способности квантовых точек через кожу. В работе (Ryman-Rasmussen et al., 2007) изучалось влияние размера, заряда и формы квантовых точек на глубину их проникновения через кожу свиньи *in vitro*. При этом мелкие сферические квантовые точки, в

отличие от крупных квантовых точек эллиптической формы, проходили через эпидермис и накапливались в дерме. В то же время прохождения квантовых точек через все слои кожи авторы этой работы не наблюдали. Проникновение наночастиц железа, имеющих диаметр менее 10 нм, в дерму кожи человека *in vitro* было показано в работе (Baroli et al., 2007). Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что «мелкие» наночастицы могут преодолевать кожный барьер, особенно в условиях повреждения кожи или ее заболеваний.

Пероральное поступление наночастиц представляет собой еще один путь их попадания в организм и возможно в случае контаминации наночастицами пищи, переноса наночастиц в ротовую полость с кожных покровов и, наконец, при пероральном приеме лекарственных препаратов, созданных на основе наночастиц. Хотя всасывание наночастиц в желудочно-кишечном тракте незначительно, в большинстве исследований было показано, что пероральное введение сопровождается некоторым повышением их уровня в плазме крови. Известно, что степень всасывания наночастиц в желудочно-кишечный тракт зависит от размера и характеристик поверхности, причем мелкие, нейтральные гидрофобные наночастицы всасываются лучше, чем крупные и гидрофильные (Hussain et al., 2001).

Токсичность наночастиц может быть связана с двумя основными перекликающимися механизмами – воспалением и оксидативным стрессом (Dick et al., 2003). В то же время совершенно очевидно, что далеко не все наночастицы обладают способностью индуцировать воспаление и оксидативный стресс. Так, например, в исследовании (Xia et al., 2006) было обнаружено, что оксид титана, нанодисперсный углерод и карбоксилированный полистирол не вызывали окислительного стресса в линии макрофагов мыши, тогда как катионный полистирол и наночастицы, загрязняющие воздух, вызывали значимое усиление образования свободных радикалов. Потенциальная токсичность некоторых типов наночастиц может быть связана со специфическими механизмами: в частности, катионные дендримеры могут вызывать дезинтеграцию плазмалеммы за счет взаимодействия положительно заряженных терминальных группировок дендримера и отрицательно заряженных липидов, входящих в состав мембраны (Mecke et al., 2004).

Установлено, что провоспалительные эффекты наночастиц зависят от площади их поверхности. Так, ингаляция наноразмерных частиц оксида титана в течение 3 мес. вызывала более выраженные воспалительные изменения в легких, чем ингаляция микрочастиц того же вещества (Oberdörster et al., 1994). Аналогичная зависимость провоспалительного эффекта от удельной площади поверхности наблюдалась и для углеродных наночастиц в экспериментах на крысах. С другой стороны, некоторые исследования не подтверждают зависимость выраженности воспалительного ответа от размера и площади поверхности наночастиц (Warheit et al., 2007). Существует мнение, что наличие провоспалительных эффектов наночастиц зависит не от площади их поверхности, а от свойств поверхности как таковой. В исследовании (Warheit et al., 2006) реактивность поверхности кварцевых наночастиц различного размера оценивалась с помощью гемолитического потенциала. При этом выраженность воспалительных изменений в легких коррелировала не с размером наночастиц, а с реактивностью их поверхности.

Исследования кожной токсичности НМ не выявили сколько-нибудь значимых негативных эффектов при локальном нанесении на кожу различных рецептур, содержащих наночастицы. С другой стороны, некоторые НМ обладали достаточно высокой цитотоксичностью, выявленной на клеточных культурах *in vitro* (Sayes et al., 2006). Такое противоречие с результатами, полученными *in vivo*, может объясняться меньшей проникающей способностью наночастиц через интактную кожу. Эта точка зрения находит дополнительное обоснование в виде результатов экспериментов, которые показали формирование крупных гранул при подкожной имплантации нанотрубок крысам (Sato et al., 2005).

Исследования острой системной токсичности наночастиц немногочисленны, а результаты этих исследований свидетельствуют о том, что большинство наноматериалов могут быть отнесены к разряду умеренно токсичных и малотоксичных по классификации Hodge и Sterner (1949). LD₅₀ этих веществ колеблется от 50 до 5000 мг/кг. Интересным является тот факт, что органы-мишени для большинства наночастиц входят в состав ретикуло-эндотелиальной системы. Так, например, при ис-

следовании острой системной токсичности G3 катионного меламинавого дендримера в качестве органа-мишени была идентифицирована печень (Neermana et al., 2004). Эти данные вполне объяснимы, поскольку наночастицы после опсонизации действительно активно захватываются элементами ретикуло-эндотелиальной системы. Поскольку наночастицы, используемые в биомедицинских целях, зачастую покрывают биосовместимыми покрытиями, затрудняющими их распознавание и поглощение фагоцитами, органы-мишени для таких частиц могут быть иными. В частности, важную роль в элиминации такого рода наночастиц могут играть почки. Такие наночастицы, как углеродные нанотрубки, водорастворимые производные фуллеренов и дендримеры невысоких порядков преимущественно, выводятся из организма почками (Stern, McNeil, 2008).

Известно, что некоторые наночастицы вызывают нарушение функции лизосом. Так, например, было показано, что кварцевые наночастицы могут вызывать повышение проницаемости мембраны лизосом и высвобождение лизосомальных ферментов с последующим запуском апоптоза альвеолярных макрофагов (Thibodeau et al., 2004). Активация аутофагии *in vitro* была отмечена под действием наноразмерных частиц оксида неодима (Chen et al., 2005), квантовых точек и фуллеренов (Yamawaki, Iwai, 2006).

Ответственность за исследование риска, связанного с воздействием НМ на человека, была возложена на новую дисциплину – нанотоксикологию. В настоящее время самыми важными вопросами, которые должна решать нанотоксикология, следует считать изучение фундаментальных закономерностей проявления биологических и токсических эффектов наночастиц в зависимости от их всевозможных свойств и воздействий. Многие ученые высказывают опасения по поводу безопасности использования наночастиц. На данный момент можно рассмотреть только уже доказанные воздействия наночастиц и оценить по той малой доли полученной информации об исследованиях токсикологического воздействия наночастиц и наноматериалов весь возможный спектр их негативного влияния на живые организмы, особенно учитывая возрастающее количество внедряемых в обиход чело-

века новых НМ. Ниже приведены примеры доподлинно доказанных исследованиями негативных воздействий, распространенных в окружающей нас среде наночастиц:

– полупроводниковые нанокристаллы, содержащие CdSe/ZnS, являются ультратонкими наночастицами, способными проникать при ингаляционном пути поступления через обонятельный тракт в головной мозг и центральную нервную систему (Oberdorster et al, 2005);

– большинство животных, получавших наночастицы меди, проявляют симптомы поражения желудочно-кишечного тракта – снижение аппетита, диарею, рвоту. У животных, получавших наночастицы меди, наблюдали вялость, дрожь, судороги (Chen et al, 2006);

– наночастицы TiO_2 , могут стимулировать выработку свободных радикалов и обладают сильным окислительным эффектом. По данным ряда исследователей, ингаляционное поступление приводит к повышению числа клеток крови, отвечающих за воспаление в бронхоальвеолярных смывах, и распределению наночастиц в легких (Warheit et al., 2007);

– наночастицы оксида цинка (71 нм) в лабораторных исследованиях на культурах клеток рака легких человека продемонстрировали снижение жизнеспособности клеток и наличие дозозависимого эффекта, а при проведении электрофореза одиночных клеток в геле была установлена способность наночастиц оксида цинка вызывать повреждение ДНК (Sahoo et al., 2007);

– исследования наночастиц алюминия (10 нм) установили способность изучаемых наночастиц подавлять синтез м-РНК, вызывать пролиферацию эндотелиальных клеток, выступать в качестве индуктора проатерогенного воспаления и молекулярного модулятора на уровне РНК к ДНК и приводить к болезни Альцгеймера (Sahoo et al., 2007);

– в процессе образования фуллеренов из графита образуются также структуры, составленные, как и в случае графита, из шестичленных колец углерода. Среди них выделяются наночастицы и нанотрубки. Обладающие высокой биоустойчивостью

нанотрубки вызывают воспаление и фиброзные изменения в легочной ткани (Warheit et al., 2004).

Учитывая вышеизложенные и многие другие факты воздействия наночастиц, актуальность проблемы токсичности наноматериалов и наночастиц нельзя не принимать во внимание, особенно в век их стремительного развития. Токсичность наночастиц при различных путях поступления в организм, оценка степени потенциального вреда здоровью населения и персонала, разработка физико-химических методов анализа наночастиц представляются важной сферой научных исследований, нуждающейся в серьезном финансировании.

Наночастицы обладают рядом уникальных физико-химических характеристик, определяющих особенность их токсикологических свойств, отличающих наночастицы от более крупных частиц того же вещества. К ним относится малая величина – до 100 нм; крайне высокая удельная поверхность и высокая поверхностная активность; уникальная химическая структура наночастиц, не имеющая аналогов среди крупных частиц, а также высокая степень взаимодействия между наночастицами. Эти свойства определяют особенности токсикинетики наночастиц (Monteiro-Riviere, 2007).

Разработка системы методов оценки токсического действия наночастиц и экстраполяция данных экспериментальных исследований на человека являются одной из актуальных задач нанотоксикологии. Важным этапом исследований является определение физико-химических характеристик наночастиц:

- распределение по величине;
- состояние агломерации;
- кристаллическая структура;
- химический состав;
- площадь поверхности;
- структура и заряд поверхности;
- пористость.

Токсикологическое изучение наночастиц проводится *in vivo* в первичных и долговременных культурах клеток (эпителиальных клеток, макрофагов, фибробластах, клеток эндотелия и т.д.) в эксплантах тканей различных органов-мишеней (легких, кожи, ЦНС, почек и др.). В экспериментах на лабораторных животных при различных путях введения определяют параметры острой токсичности. В хронических экспериментах изучают влияние наночастиц на жизненно важные органы и системы (ЦНС, дыхательную, сердечно-сосудистую, пищеварительную, эндокринную, иммунную, выделительную и репродуктивные).

Проводится изучение различных видов специфической токсичности:

- эмбриотоксического;
- тератогенного;
- мутагенного;
- канцерогенного;
- аллергизирующего и иммунотоксического действия.

Подводя итог, следует отметить, что нанотоксикология как самостоятельная область наномедицины в настоящее время находится в самом начале своего развития. Информация о потенциально опасных воздействиях наночастиц на организм человека плохо систематизирована, а имеющиеся данные зачастую требуют подтверждения на других, более релевантных моделях. Есть данные о возможности накопления наночастиц (на примере церия) в биологической системе после хронического воздействия и двойной роли сигнализация/разрушение пары $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$. При микромолярных дозах (<300 мкМ) нано- CeO_2 активирует Nox2- (и, возможно, Nox4)-зависимое продуцирование ОФК на мембране, взаимодействует с сигнальными путями, ведущими к активации синтеза белка, и увеличивает активность H_2O_2 - и GSH-связанных ферментов. Однако эти прооксидантные свойства нано- CeO_2 в низких концентрациях не приводят к какой-либо значительной цитотоксичности (Culcasi et al., 2012).

При анализе электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) подтверждается реактивность наночастиц (на примере церия) как миметик супероксиддисмутазы (SOD) (Heckert et al., 2008). Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS)

и УФ-видимый анализ нанокерии, обработанной перекисью водорода, показывают, что уменьшение содержания $\text{Ce}^{3+/4+}$ коррелирует непосредственно с потерей миметической активности SOD. Эти результаты наглядно свидетельствуют о том, что состояние поверхностного слоя нанокерии играет важную роль в миметической активности SOD и способность нанокерии очищать супероксид напрямую связана с концентрацией церия (III) на поверхности частиц (Heckert et al., 2008).

В исследовании Даз с соавторами (Das et al., 2012) было продемонстрировано уникальное свойство наночастиц оксида церия индуцировать ангиогенез как *in vitro*, так и *in vivo*. В частности, наночастицы оксида церия запускают ангиогенез, модулируя внутриклеточную кислородную среду и стабилизируя гипоксию, индуцируя фактор 1α эндогенно. Кроме того, были также изучены корреляции между физико-химическими свойствами НЧ и ангиогенезом, включая поверхностное соотношение $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$, поверхностный заряд, размер и форму. Высокая площадь поверхности и увеличение соотношения $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ делают НЧ более каталитически активными для регулирования внутриклеточного кислорода, что в свою очередь приводит к более устойчивой индукции ангиогенеза (Das et al., 2012).

В исследовании Т. Нагамуры и Е. Траверза (Naganuma, Traversa, 2014) poly-L-lactide (PL) был функционализирован с помощью наночастиц оксида церия, которые в последнее время привлекли внимание исследователей для использования в терапии из-за каталитической способности Ce^{4+} и Ce^{3+} . Результаты пролиферации различных клеток, модифицированных наночастицами оксида церия с разным поверхностным зарядом и гидрофобностью/гидрофильностью, указывают на то, что состояния валентности Ce тесно коррелируют со специфическими клеточными морфологиями и взаимодействиями «клетка-клетка», которые вызывают пролиферацию клеток (Naganuma, Traversa, 2014).

В мире современных технологий каждый год появляется много новых материалов, но наибольший рост наблюдается среди наноматериалов: нановолокна, нанотрубки, нанополлимеры, наностержни, иммобилизированные наночастицы, квантовые точки и еще ряд экзотических структур. Большинство новых наноматериалов имеют углеродную природу, но есть металлические, силикатные, целлюлозные и

иные структуры. Растет объем их присутствия в жизни человека и окружающей среде, так как из лабораторных образцов, получаемых в микрограммовых количествах, они вырастают в многотонные производства.

В последние годы в нашей стране открываются новые предприятия, производящие углеродные наноматериалы. Объемы производства выросли в сотни раз. Однако и уровень потребления углеродных нановолокон неуклонно растет. Ожидается, что в 2022 г. объем рынка составит уже 6,7 тыс. т.

В мире ведущими компаниями-производителями нановолокон являются:

- Showa Denko – Япония;
- Applied Sciences Inc – США.

Увеличение объемов производства углеродных наноматериалов в мире ведет к росту опасности попадания их в окружающую среду. Сообщения о токсичности наноматериалов в мировой литературе начали появляться сравнительно недавно (с начала 2000-х гг.), и поиск в данном направлении продолжается (Andón et al., 2013).

Недавние исследования показывают очень многообещающий клинический потенциал наночастиц для использования в качестве контролируемых систем высвобождения и доставки лекарств/активных веществ. Кроме того, наночастицы могут использоваться при диагностической визуализации кожных заболеваний. Однако наночастицы могут также нести риск цитотоксичности и побочных эффектов (Niska et al., 2017). Это подтверждается и другими исследователями. Однослойные углеродные нанотрубки могут быть перспективными средствами доставки для диагностики рака и химиотерапии из-за их уникальных свойств, в том числе замечательной проницаемости клеточной мембраны, высокой способности к переносу лекарственных средств, рН-зависимой терапевтической разгрузки, продолжительного времени циркуляции и внутренних флуоресцентных, фототермических, фотоакустических и комбинационных свойств (Meng et al., 2012).

Наночастицы оксидов металлов (MeO-НЧ) вводятся в окружающую среду с помощью различных путей, таких как удаление отходов (удаление сточных вод, удаление твердых отходов), преднамеренное применение для различных целей, случайное высвобождение в процессе производства и потребления. Среди этих

маршрутов сброс сточных вод является основным путем выхода НЧ в окружающую среду. Основными процессами трансформации являются агрегирование/агломерации, адсорбции, осаждения, растворения, окислительно-восстановительные реакции и взаимодействия с макромолекулами с помощью различных механизмов, и эти процессы являются взаимосвязанными явлениями НЧ в окружающей среде. На эти процессы влияют: размер, морфология, поверхностный заряд, условия среды, рН, температура и присутствие различных компонентов (белки, полисахариды, радикалы, поверхностно-активные вещества). Есть MeO-НЧ, которые биодоступны в своей наноформе для биоты. Однако большинство НЧ преобразуется в другие формы (их соответствующие ионы металлов и другие продукты), которые более биодоступны, чем их источники. Более или менее стабильные НЧ менее биодоступны, чем те, что претерпевают различные изменения в окружающей среде. Биодоступность MeO-НЧ в окружающей среде зависит от таких параметров, как физико-химические свойства (тип НЧ, размер и морфология), тип материалов для покрытия и стабилизирующих агентов (если они используются), химия среды, режимы применения, путь воздействия (Amde et al., 2017).

Нанотехнологии становятся многообещающими технологиями во многих секторах общества. Однако все большее использование инженерных наноматериалов вызывает озабоченность по поводу непреднамеренного воздействия этих материалов и возможности для неблагоприятного воздействия на здоровье человека и окружающую среду. Несмотря на несколько лет интенсивных исследований, общепринятая парадигма для понимания токсичности, вызванной наночастицами, остается прочной. В основном изучается так называемая парадигма окислительного стресса, который представляет собой вторичное событие, неизбежно возникающее из-за нарушения биохимических процессов и кончины клетки или конкретного неслучайного события, которое играет роль в индукции повреждения клеток, например апоптоз. Ответ на этот вопрос будет иметь важные последствия для разработки стратегий смягчения неблагоприятного воздействия наночастиц (Shvedova et al., 2012).

1.2. Влияние наночастиц на живые организмы

Влияние наночастиц на растения

Рассмотрим влияние наночастиц на растения, как на низшие, так и на высшие. Применение нанотехнологий в сельском хозяйстве находится на стадии становления (El-Shazoly, Amro, 2019; Agathokleous et al., 2020). Наука ведет к разработке целого ряда недорогих способов использования нанотехнологий для увеличения роста растений. Наночастицы и нанокапсулы являются эффективным средством для распределения пестицидов и удобрений контролируемым образом с высокой специфичностью доставки, что снижает побочный ущерб (Rodríguez-González et al., 2019). В контексте взаимодействия растений с патогенами применение технологии наночастиц и эффективная транспортировка веществ, таких как системные химикаты, к конкретным участкам обеспечивают новые решения для обработки растений (Fincheira et al., 2020).

Исследования влияния наночастиц на сельскохозяйственные растения только начались (Zhu et al., 2019; Ke et al., 2020). Так, на культурах яровой пшеницы, гороха и подсолнечника показано двоякое влияние углеродных наноматериалов. С одной стороны, УНМ «Таунит» оказывает негативное влияние на процессы раннего вегетативного онтогенеза, но, с другой стороны, позитивное влияние на развитие корневой системы, всхожесть семян и на их защищенность от гниения (Гусев и др., 2010).

В исследовании на растениях рапса показано, что нанотрубки стимулируют нарастание стеблей и корней, но при этом отмечается, что наноматериалы подавляют энергию прорастания и всхожесть семян (Гусев и др., 2013). В статье «Токсичность различных наноматериалов при обработке семян яровой пшеницы» (Голубева, Полищук, 2012) продемонстрировано, что препараты наноуглеродных трубок оказывают стимулирующее действие на посевные и морфологические показатели проростков, а вот токсического действия на проростки пшеницы не зафиксировано. Как мы видим, данный вопрос также остается открытым.

Взаимодействие растительной клетки с наночастицами приводит к модификации экспрессии генов растений (Ghosh et al., 2019) и связанных с ними биологических путей, которые в конечном счете влияют на рост и развитие растений. Поэтому в будущих исследованиях следует также подчеркнуть необходимость уточнения нанотоксичности для растений, возможного поглощения и транслокации наночастиц растениями, а также физических и химических свойств наночастиц в ризосфере и на поверхностях корней (Nair et al., 2010).

В исследовании Сендры с соавторами (Sendra et al., 2017) была оценена токсичность Ag НЧ различных размеров для двух видов микроводорослей из пресноводной и морской среды (соответственно *Chlamydomonas reinhardtii* и *Phaeodactylum tricornutum*). Как оказалось, процессы растворения влияют на форму и концентрацию наночастиц Ag в обеих средах. Оценка токсикологических реакций, в частности роста, размера клеток, сложности клеток, хлорофилла *a*, активных форм кислорода, повреждение клеточной мембраны, и эффективный квантовый выход PSII подтвердили существование различных механизмов токсичности для микроводорослей. Косвенные эффекты, в частности растворенные ионы Ag, по-видимому, контролируют токсичность для пресноводных микроводорослей, тогда как прямые эффекты, особенно прикрепление к поверхности клетки и интернализация наночастиц Ag внутри клеток, скорее всего, определяют токсичность для изучаемых морских видов. Это исследование способствует получению знаний о роли внутренних и внешних факторов в определении поведения НЧ в различных водных средах и взаимодействия с микроводорослями (Sendra et al., 2017).

Похожих работ много. Тесты на ингибирование роста водорослей были проведены Ченом с соавторами (Chen et al., 2018) для изучения потенциальной токсичности наночастиц Co на морских микроводорослях *Platymonas subcordiformis*, *Chaetoceros curvisetus* и *Skeletonema costatum*. Это один из первых случаев систематического изучения токсичности наночастиц Co для морских водорослей. Результаты исследования показали, что наночастицы Co были токсичны для всех трех водорослей (Chen et al., 2018).

В работе Ху с соавторами (Hu et al., 2018) были исследованы биологические эффекты наночастиц TiO_2 на морских микроводорослях *Isochrysis galbana*. Также была исследована кинетика агрегации наночастиц TiO_2 в различных условиях, чтобы определить и понять эти эффекты. Установлено, что, хотя наночастицы TiO_2 не оказывали очевидного влияния на размер и воспроизводимость клеток водорослей в условиях испытаний, они оказывали отрицательное влияние на хлорофилл водорослей, что приводило к снижению фотосинтеза (Hu et al., 2018).

Положительное воздействие МУНТ на бобовое растение может дать возможность решить проблемы неэффективной инвазии ризобии и низкой активности нитрогеназы (вызванные недостатком микроэлементов). Преодоление этих трудностей может повысить урожайность бобовых (Verma et al., 2019). Точно так же углеродные точки (УТ) могут служить своего рода удобрениями в садоводстве или сельском хозяйстве и открывают новые возможности применения в нанобиотехнологии. УТ также являются отличным средством визуализации растительных тканей, которые помогают в извлечении важной информации о фитотоксичности. Что еще более важно, экзогенные применения фуллерола были полезны для улучшения устойчивости к засухе у нескольких растений (López-Moreno et al., 2018).

Была проверена гипотеза о том, что микропластики увеличивают токсичность наночастиц золота для морских микроводорослей *Tetraselmis chuii* (Davaranah, Guilhermino, 2019). В лабораторной биопробе культуры *T. chuii* подвергали 96-часовому воздействию наночастиц золота диаметром до 5 нм (НЧ Au) и первичных микропластиков диаметром 1–5 мкм (МП) отдельно и в смеси. Смесь, содержащая 3 мг/л НЧ Au + 4 мг/л МП, значительно снижала среднюю удельную скорость роста микроводорослей. Следовательно, эта смесь была более токсичной для *T. chuii*, чем ее компоненты в отдельности. В целом результаты исследования показали, что протестированные МП и НЧ Au имеют относительно низкую токсичность к *T. chuii*, но токсичность возрастает, когда они находятся в смесях, содержащих высокие концентрации обоих веществ. Эти выводы, подтверждающие концепцию, подчеркивают необходимость проведения дополнительных исследований

токсичности смесей, содержащих микропластики и наноматериалы (Davaranah, Guilhermino, 2019).

В другом исследовании (Matouke et al., 2018) оценивалось комбинированное воздействие наночастиц диоксида титана и фосфора на микроводоросль *Chlorella ellipsoidea*. В ходе изучения микроводорослей было показано, что оптическая плотность, хлорофилл *a*, *b*, общий хлорофилл и антиоксидантная активность ферментов были значительно изменены под воздействием комбинированных соединений, в то время как биомасса (хлорофилл *a* и *b*), общий уровень хлорофилла и удельная скорость роста значительно снизились. Наблюдалось увеличение MDA и POD со снижением SOD и GST в микроводорослях. Это указывает на то, что смесь обоих соединений в пресноводной экосистеме может быть вредной для микроводорослей (Matouke et al., 2018).

Потенциальный эффект синтезированных наночастиц оксида меди (CuO НЧ) на метаболическую и антиоксидантную активность был исследован на *Solanum lycopersicum* и *Brassica oleracea* var. (Singh et al., 2017). Накопление CuO НЧ у двух видов растений зависело от дозы, и результаты исследования показали, что наночастицы оксида меди активнее накапливаются томатами, чем цветной капустой, возможно, из-за различий в морфологии корней. Дальнейшие исследования показали, что воздействие наночастиц оксида меди привело к значительному снижению содержания пигмента и сахара в обоих тестируемых растениях. Кроме того, воздействие наночастиц оксида меди приводило к избыточному перекисному окислению липидов и активности СОД при повышенной концентрации в обоих растениях. Обнаружение АФК *in vivo* путем гистохимического окрашивания показало увеличение продукции АФК и лигнификацию клеток корня у обоих испытуемых видов (Singh et al., 2017).

Исследованиями Джасима с соавторами (Jasim et al., 2017) было обнаружено, что обработка саженцев пажитника биосинтезированными наночастицами серебра (Ag-НЧ) оказывает значительное влияние на параметры его роста, такие как количество листьев, длина корня, длина побега и вес во влажном состоянии. Проростки,

обработанные Ag-НЧ, показали увеличение производства основного фитохимического соединения – диосгенина – до уровня $214,06 \pm 17,07$ мкг/мл. Необработанный контроль давал выход только $164,44 \pm 7,67$ мкг/мл диосгенина, и наблюдаемый эффект фитохимического усиления, индуцированный Ag-НЧ, был очень значительным. Примечательно, что Ag-НЧ, использованные в исследовании, обнаружили двойную роль в усилении роста растений и синтеза диосгенина (Jasim et al., 2017).

Наноматериалы могут изменять хлорофилл и каротин в растениях, повышать уровень растительного белка, улучшать скорость фотосинтеза растений; способствуют росту, повышают плодородие почвы и снижают доступность и токсичность тяжелых металлов для растений. Тем не менее наноматериалы токсичны для растений в высоких концентрациях, главным образом вызывая задержку роста, различные реакции токсичности листьев и т.д. (Zhu et al., 2019).

Влияние наночастиц оксида цинка (НЧ ZnO) и наночастиц сульфида цинка (НЧ ZnS) на токсичность осадков сточных вод в почвах с измененными осадками сточных вод было изучено в отношении видов растений (*Lepidium sativum*) и почвенных бактерий (*Folsomia candida*) (Oleszczuk et al., 2019). Токсичность НЧ ZnO и ZnS для растений зависела от осадка сточных вод. Когда осадок сточных вод не был токсичным, наблюдалось положительное влияние НЧ ZnO или ZnS на *L. sativum*. Когда осадок сточных вод был токсичным, присутствие НЧ ZnO или ZnS значительно уменьшало его негативное влияние на растения. В случае *F. candida*, самая низкая концентрация НЧ не значительно ингибировать или стимулировать токсичность. Концентрация НЧ ZnO или ZnS, превышающая 250 мг/кг, независимо от уровня токсичности осадка сточных вод, в большинстве случаев повышает токсичность НЧ ZnO/ZnS по отношению к *F. candida*. Следует подчеркнуть, однако, что очень часто НЧ ZnS стимулировали или были менее токсичны для *L. sativum* или *F. candida* чем НЧ ZnO, применяемые в той же дозе. (Oleszczuk et al., 2019).

Потенциальные области для будущих исследований с использованием УНМ и растений включают в себя: 1) механизмы поглощения и перемещения; 2) накопление и концентрацию УНМ в растениях, поскольку УНМ являются одним из

наиболее сложных для количественного определения объектами; 3) различия в ответах на УНМ, которые происходят между разными видами растений и 4) изменения гормонов и других метаболитов, а также эпигенетические механизмы, которые могут быть затронуты присутствием УНМ (Jordan et al., 2018). В сельском хозяйстве нанодобрения играют важную роль в повышении продуктивности сельскохозяйственных культур и минимизации проблем загрязнения окружающей среды. Были исследованы возможные последствия использования двух инженерных НМ – нанохитозана (Cs) и углеродных нанотрубок (УНТ) – в качестве удобрения для растений французской фасоли (Abdel-Aziz et al., 2019). Из полученных результатов видно, что листовая подкормка лучше, чем грунтовка семян. Наблюдается улучшение роста, урожайности и антиоксидантной системы растений и биохимического содержания полученных семян внекорневого внесения по сравнению с грунтовкой семян и контролем. К тому же обработка листьев сокращала сроки сбора урожая без снижения урожайности на 37,5 % (80 дней) по сравнению с контрольной и посевной обработкой семян (110 дней). Представляет интерес то, что наночастицы Cs, по-видимому, улучшают параметры роста и урожайности в большей степени, чем нанотрубки, при обработке листового применения. Таким образом, листовое применение нанодобрений обладает огромным потенциалом для улучшения урожайности, и рекомендуется использовать нанодобрения с внекорневым применением (Abdel-Aziz et al., 2019).

Результаты работы Киббета и Стреветта (Kibbey, Strevett, 2019) показали, что как положительно заряженные модифицированные амином полистирольные наносферы, так и наночастицы оксида титана (TiO_2) значительно ингибируют количество бактерий в ризосфере и рост растений в исследуемой системе. Напротив, отрицательно заряженные сульфат-модифицированные полистирольные наносферы, по-видимому, увеличивают количество бактерий в ризосфере, но не оказывают значительного влияния на рост растений. Эти результаты показывают, что одним из потенциально важных механизмов, посредством которых наночастицы могут препятствовать росту растений, может быть вмешательство в рост, прикрепление или

функцию ризосферных бактерий. Обнаружено значительное прикрепление положительно заряженных модифицированных амином полистирольных наносфер к поверхности корней, но не установлено заметного прикрепления двух других изученных наночастиц. Предполагается, что аналогичное воздействие как модифицированного амином полистирола, так и TiO_2 на ризосферные бактерии и на рост растений может быть результатом прикрепления наночастиц к самим бактериям и влияния прикрепления на сродство бактерий к корневым поверхностям (Kibbey, Strevett, 2019).

По содержанию хлорофилла в водорослях установили, что наночастицы серебра (Ag НЧ) подавляли рост зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* более заметно, чем AgNO_3 , независимо от присутствия EPS (внеклеточных полимерных веществ) в водорослях. Предполагается, что Ag НЧ оказали большее токсическое воздействие на водоросли, чем ионы серебра. Полученные данные свидетельствуют о том, что барьерный эффект ЭПС дал наночастицам необычайное преимущество над ионами, но ЭПС не оказал заметного влияния на взаимодействие клеток водорослей с ионами серебра, выделяющимися из Ag НЧ и AgNO_3 , а также на влияние Ag НЧ и AgNO_3 на рост водорослей (Zheng et al., 2019).

В исследовании Гонга и соавторами (Gong et al., 2019) рассматривалась стабильность наночастиц оксида никеля (nNiO) в морской воде, включая их способность к агрегации и высвобождению ионов. Кроме того, была исследована связь между этими свойствами и их токсичностью для морских водорослей *Chlorella vulgaris*. Результаты исследования показали, что НЧ NiO ингибировали рост клеток водорослей и уменьшали в них содержание хлорофилла, что было связано с эффектом затенения при агрегации НЧ NiO в морской воде (Gong et al., 2019).

В исследовании Лу с соавторами (Luo et al., 2018) подвергали воздействию неорганического As (арсенит и арсенат) две пресноводные водоросли (*Microcystis aeruginosa* и *Scenedesmus obliquus*) с целью углубления понимания биоаккумуляции и метилирования As в присутствии нано- TiO_2 . Таким образом, нано- TiO_2 в качестве носителей стимулировали накопление и метилирование As у этих двух ви-

дов водорослей. В частности, нано-TiO₂ может заметно увеличить накопление арсената (As (V)) у *M. aeruginosa* и накопление арсенита (As (III)) у *S. obliquus* (Luo et al., 2018).

Ву с соавторами (Wu et al., 2019) было проведено изучение влияния различных концентраций (0,1, 1,0, 10,0, 50,0, 100,0 мг/л) наночастиц диоксида титана (TiO₂) на водоросли *Microcystis aeruginosa*. Результаты исследования показали, что TiO₂ НЧ значительно снижали максимальную фотохимическую эффективность фотосистемы II и, таким образом, ингибировали фотосинтетическую активность *M. aeruginosa*. Они также увеличили содержание активных форм кислорода (АФК) и малонового диальдегида (МДА), что указывает на окислительный стресс у водорослей. Кроме того, TiO₂ НЧ в высоких концентрациях (50 и 100 мг/л) агрегируют на поверхности водорослей и блокируют свет, в данном случае ингибируют рост водорослей (16,03 ± 2,50 % и 54,13 ± 0,93 %), но индуцируют продукцию (25,02 ± 1,23 % и 114,43 ± 2,96 %) и высвобождение (20,96 ± 13,30 % и 12,10 ± 8,80 %) МС (микроцистинов) (Wu et al., 2019).

В своем исследовании Ян с соавторами (Yan et al., 2019) оценили потенциальную токсичность нового материала наночастиц – квантовых точек CdSe – с использованием двух зеленых водорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Scenedesmus obliquus*. Также были рассмотрены и сравнены влияние квантовых точек CdSe и ионов кадмия на водоросли. Результаты исследования показали, что скорость роста водорослей и содержание хлорофилла снижались с увеличением концентраций и продолжительности воздействия. Кроме того, глутатион-уровни были уменьшены, в то время как активность супероксиддисмутазы увеличилась, демонстрируя свои основные функции и вызывая токсический стресс. Увеличение уровней малонового диальдегида показало, что напряжения КТ CdSe и ионов кадмия способствовали возникновению окислительного повреждения. Данное исследование продемонстрировало, что влияние КТ CdSe было сильнее, чем влияние нитрата кадмия, и реакция водорослей также была видоспецифичной (Yan et al., 2019).

Влияния наночастиц на растения не однозначно и зависит от материала, из которого они получены и стадии развития. Наночастицы негативно влияют на развитие и рост микроводорослей.

Влияние наночастиц на животных

Наночастицы оксида железа с оксидом кремния обладают превосходными магнитными свойствами. Кроме того, они нетоксичны для первичных макрофагов, полученных из моноцитов человека, во всех тестируемых дозах, тогда как дозозависимая токсичность более мелких наночастиц с покрытием из диоксида кремния (30 и 50 нм) наблюдалась для дендритных клеток, полученных из первичных моноцитов. При введении наночастиц в культуру клеток не наблюдалось секреции провоспалительных цитокинов макрофагами или дендритными клетками. Клеточная интернализация наночастиц, покрытых диоксидом кремния, осуществлялась через активный актиновый цитоскелет-зависимый механизм. Новые наночастицы оксида железа с покрытием из оксида кремния являются перспективными материалами для медицинской визуализации, отслеживания клеток и других биомедицинских применений (Kunzmann et al., 2011).

Тем не менее кремневые наночастицы представляют собой перспективный метод репродуктивной биологии с потенциалом повышения безопасности и эффективности существующих методологий, включая экспериментальную генную терапию и передачу генов, опосредованных сперматозоидами. Мезопористые наночастицы кремнезема (МПНЧК) были охарактеризованы как мощный и безопасный инструмент доставки, что делает их отличным кандидатом для использования в репродуктивных исследованиях. Было показано, что сферические МПНЧК с гексагональной симметрией пор, функционализированные с полиэтиленгликолем и аминопропилтриэтоксисиланом и нагруженные нуклеиновой кислотой и белком, образуют сильные ассоциации со сперматозоидами кабана после инкубации *in vitro* и не оказывают отрицательного влияния на основные параметры функции сперматозоидов, включая подвижность, жизнеспособность, акросомальный статус и индекс фрагментации ДНК (Barkalina et al., 2014).

Иглокожие

В экспериментах на личинках морских ежей показано, что углеродные нанотрубки разного диаметра проявляли токсическое действие: вызывали аномалии в развитии зародышей уже через 2 ч инкубации в концентрации 5 мг/мл, а через 24 ч наблюдалась их гибель (Голохваст и др., 2013). После воздействия на сперматозоиды морских ежей *Paracentrotus lividus* НЧ CuO были оценены биомаркеры жизнеспособности, цитотоксичности, окислительного стресса и генотоксичности, а также морфологии сперматозоидов. Результаты исследования показали, что воздействие CuO НЧ снижает жизнеспособность сперматозоидов, нарушает митохондриальную активность и увеличивает выработку активных форм кислорода (АФК) и перекисное окисление липидов. Кроме того, воздействие CuO НЧ вызвало повреждение ДНК и морфологические изменения. Вместе с проведением антиоксидантных экспериментов по спасению эти результаты свидетельствуют о том, что окислительный стресс является основным фактором спермиотоксического действия CuO НЧ. Предполагается, что механизм токсичности – это самопроизвольная генерация АФК, индуцируемая НЧ CuO, и нарушение митохондриальной дыхательной цепи, которые приводят к выработке АФК, что в свою очередь вызывает перекисное окисление липидов и повреждение ДНК и в конечном счете приводит к появлению дефектных сперматозоидов, вызывая цитотоксичность сперматозоидов (Gallo et al., 2018).

В другом исследовании (Giannetto et al., 2018) оценили потенциальную роль окислительного стресса в токсичности CuO НЧ, исследуя молекулярный ответ эмбрионов морского ежа *Arbacia lixula* на три концентрации CuO НЧ (0,7, 10,0, 20,0 части на миллиард) и изучая транскрипционные паттерны генов, связанных с окислительным стрессом. Зависимые от времени и концентрации изменения в экспрессии генов были обнаружены у эмбрионов *A. lixula*, подвергнутых воздействию НЧ CuO, вплоть до стадии плутеуса (72 ч после оплодотворения), что указывает на то, что окислительный стресс является одним из механизмов токсичности для НЧ CuO (Giannetto et al., 2018).

Черви

В исследовании Ванга с соавторами (Wang H. et al., 2009) токсичность микро- и наночастиц ZnO, Al₂O₃ и TiO₂ оценивалась на нематодах *Caenorhabditis elegans* с *Escherichia coli* в качестве источника пищи. Все наночастицы и микрочастицы были токсичными, препятствуя росту и особенно репродуктивной функции нематоды. LC₅₀ после 24-часовой экспозиции для наночастиц ZnO (2,3 мг/л), Al₂O₃ (82 мг/л) и TiO₂ (80 мг/л) (Wang H. et al., 2009).

Наночастицы TiO₂ усиливают токсическое действие других загрязнителей, таких как мышьяк, CdCl₂. Результаты, полученные Nunes с соавторами (2017), показали, что совместное воздействие As⁺ nano-TiO₂ влияет на метаболизм As, способствующий накоплению DMA, которое считается умеренно токсичной формой мышьяка, а в долгосрочной перспективе может оказывать вредное воздействие. Кроме того, совместное воздействие было опасным для *Laonereis acuta* и проявляло синергетический эффект в таких параметрах, как содержание АФК и общая антиоксидантная способность. Кроме того, совместная экспозиция вызвала окислительный стресс и повреждение ДНК, поэтому следует тщательно проанализировать использование нано-TiO₂. Совместное использование наночастиц TiO₂ и CdCl₂ показало, что стабильность генома снижалась после их воздействия. Наночастицы TiO₂ отвечали за хромосомные изменения, но были неэффективны с точки зрения повреждения ДНК (Nigro et al., 2015).

Ракообразные

Токсичность наночастиц ZnO, TiO₂ и CuO оценивалась на ракообразных *Daphnia magna* и *Thamnocephalus platyurus* в зависимости от размера и растворимости наночастиц. Токсичность по отношению к *T. platyurus* была в значительной степени объяснена растворимыми ионами Cu. Однако для *D. magna* нано- и крупные частицы CuO оказались менее биодоступными, чем для бактерий. Это свидетельствует о том, что оценка составов наночастиц должна проводиться в каждом конкретном случае (Heinlaan et al., 2008). Результаты исследования токсичности НЧ

TiO₂ с использованием базового набора тестов на опасность показали их низкую опасность для *D. magna* при 96 ч воздействии (Warheit et al., 2007a).

Исследователи изучили токсичность наночастиц Al₂O₃, неорганического мышьяка As со степенью окисления V и их комбинацию на *Ceriodaphnia dubia* в качестве модельного организма. При воздействии наночастиц Al₂O₃ наблюдалась частичная смертность при концентрациях более 200 мг/л. Однако наночастицы Al₂O₃ значительно повышают токсичность As (V) (Wang et al., 2011).

На *D. magna* оценивалась токсичность четырех различных видов наночастиц (диоксид титана, наночастиц бора и двух типов наночастиц алюминия (ALEX и L-ALEX)) (Strigul et al., 2009). Было обнаружено, что наночастицы диоксида титана демонстрируют низкий уровень токсичности и значения LD₅₀ не могут быть рассчитаны. Напротив, наночастицы бора с EC₅₀ в диапазоне от 56 до 66 мг/л могут быть классифицированы как «вредные» для водных микроорганизмов. Рассмотрены возможные механизмы токсичности наночастиц и потенциальные проблемы в экотоксикологическом тестировании наноматериалов. Изученные наноматериалы могут быть ранжированы в следующем порядке по их острой токсичности на *D. magna*: наночастицы бора > ALEX > L-ALEX > TiO₂ (Strigul et al., 2009).

Целью исследования Rotini с соавторами (2018) было оценить токсичность НЧ CuO для подходящих индикаторных видов, относящихся к экологически значимому уровню потребителей. В отобранных биоанализах используются эталонные протоколы для определения влияния/летальных концентраций (E (L) C) путем оценки летальных и сублетальных конечных точек. Тесты на смертность проводили на коловратках (*Brachionus plicatilis*), креветках (*Artemia franciscana*) и копеподах (*Tigriopus fulvus*), в то время как на *T. fulvus* и морском еже (*Paracentrotus lividus*) оценивалось влияние на линьку и скорость оплодотворения. Распределение по размерам и скорости осаждения наночастиц CuO вместе с растворением меди также анализировали в экспозиционной среде. Оценка экотоксичности CuO НЧ показала зависимый от концентрации ответ для всех видов, что указывает на одинаковую смертность для *B. plicatilis* (48h LC₅₀ = 16,94 ± 2,68 мг/л) и *T. fulvus* (96h LC₅₀ = 12,35 ± 0,48 мг/л) с последующим по *A. franciscana* (48h LC₅₀ = 64,55 ± 3,54 мг/л).

Сопоставимые значения EC_{50} были также получены для сублетальных конечных точек у *P. lividus* ($EC_{50} = 2,28 \pm 0,06$ мг/л) и *T. fulvus* ($EC_{50} = 2,38 \pm 0,20$ мг/л). Соли меди продемонстрировали более высокую токсичность, чем НЧ CuO для всех видов, с общей тенденцией чувствительности следующим образом: *P. lividus* \geq *T. fulvus* (сублетальная конечная точка) \geq *B. plicatilis* $>$ *T. fulvus* (летальная конечная точка) $>$ *A. franciscana* (Rotini et al., 2018).

Насекомые

Исследование Гинга с соавторами (Ging et al., 2014) влияния УНТ на плодовую муху *Drosophila* при проглатывании *in vivo*. Было продемонстрировано снижение выживаемости при каждой дозе, протестированной с использованием функционализированные амином УНТ, в то время как не было токсичности, когда эти УНТ были покрыты эпоксидной смолой (Ging et al., 2014).

Исследованы эффекты перорального введения наночастиц TiO_2 или Ag на размножение и развитие у двух разных модельных организмов (мыши и плодовая муха *Drosophila*). Эти наночастицы могут наносить ущерб репродуктивной функции и развитию как беспозвоночных, так и позвоночных (Philbrook et al., 2011).

Моллюски

Исследование токсичности наночастиц оксида цинка проводилось на пресноводной улитке *Lymnaea luteola* (Ali et al., 2012). Наночастицы ZnO в дозе (32 мкг/мл) вызывали значительное снижение глутатиона (42,10 и 61,40 %), глутатион-S-трансферазы (25,60 и 40,24 %) и глутатионпероксидазы (21,73 и 39,13 %). Также отмечалось увеличение уровня малонового диальдегида (54,50 и 57,14 %) и каталазы (34,88 и 52,56 %) в пищеварительной железе *L. luteola* соответственно после 24 и 96-часового воздействия. Таким образом, результаты исследования показывают, что наночастицы ZnO индуцируют генотоксичность в клетках пищеварительной железы через окислительный стресс (Ali et al., 2012).

Подобные исследования проводились и на морских беспозвоночных – моллюске *Scrobicularia plana* и черве *Nereis diversicolor* (Buffet et al., 2012). Наночастицы ZnO экспонировались в дозе 3 мг/кг, так как предполагается, что такой уровень находится в донных отложениях. Биоаккумуляция Zn наблюдалась у обоих организмов, подвергнутых воздействию меченых наночастиц ZnO. На биохимическом уровне воздействие меченых наночастиц ZnO вызывало повышение активности глутатион-S-трансферазы в червях и активности каталазы в моллюсках (Buffet et al., 2012).

Токсичность наночастиц оксида цинка (ZnO НЧ) исследовалась у тихоокеанских устриц *Crassostrea gigas* (Trevisan et al., 2014). Чтобы исследовать механизмы токсичности, устрицы обрабатывались в дозе 4 мг/л в течение 6, 24 и 48 ч. Наночастицы оксида цинка накапливались в жабрах (24 и 48 ч) и пищеварительных железах (48 ч). Ультраструктурное изучение жабр показало электронно-плотные везикулы вблизи клеточной мембраны и потерю митохондриальных крист (6 ч). Опухание митохондрий и более заметная потеря митохондриальных крист наблюдались через 24 ч. Отмечены митохондрии с нарушенными мембранами и увеличенное количество цитозольных везикул с электронно-плотным материалом через 48 экспозиций. Пищеварительная железа показала подобные изменения, но они были отсрочены относительно жабр. Воздействие ZnO НЧ не оказало существенного влияния на гомеостаз тиола (восстановленный и окисленный глутатион) или иммунологические параметры (фагоцитоз, жизнеспособность и активацию гемоцитов и общее количество гемоцитов). При 24-часовом экспонировании в жабрах наблюдалось снижение (–29 %) активности глутатионредуктазы (GR), но другие биохимические реакции наблюдались только через 48 ч воздействия: более низкая активность GR (–28 %) и уровни тиолов белка (–21 %), повышенный индекс перекисного окисления липидов (+49 %) и активность GPx (+26 %). Результаты исследования показывают, что наночастицы оксида цинка накапливаются в жабрах через 24 ч, а в пищеварительной железе через 48 ч, что приводит к более раннему митохондриальному разрушению и окислительному стрессу (Trevisan et al., 2014).

Оценка биологического воздействия наночастиц TiO_2 проводилась на двустворчатых моллюсках *Limnoperna fortunei*, которые подвергались воздействию в дозах 1, 5, 10 и 50 мкг/мл (Girardello et al., 2016a, b). Результаты исследований показывают, что наночастицы TiO_2 могут повредить ДНК гемоцитов через 2 ч воздействия, а генотоксическая активность значительно увеличивается после 4-часового воздействия при всех концентрациях. Наночастицы TiO_2 не обладают мутагенным действием на клетки гемолимфы *L. fortunei*. Наночастицы TiO_2 также вызвали окислительный стресс у *L. fortunei* (Girardello et al., 2016).

При сравнении токсичности крупных частиц оксида меди с наночастицами и ионной медью наночастицы показали себя более токсичными. Воздействие наночастиц CuO и ионной меди привело к значительной биоаккумуляции Cu в мидиях: наночастицы CuO были локализованы в лизосомах пищеварительных клеток. Три формы меди влияли на активность антиоксидантных ферментов по-разному в пищеварительной железе и жабрах и гемоцитах мидий. Воздействие наночастиц CuO повысило активность антиоксидантных ферментов, указывающих на наличие окислительного стресса, и вызвало генотоксические эффекты, которые исчезли после воздействия (Ruiz et al., 2015).

Исследовалось влияние аминокислотомодифицированных полистирольных НЧ (PS-NH₂) на эмбрионы мидий (Balbi et al., 2017). PS-NH₂ влиял на развитие нормальных D-образных личинок через 48 ч после оплодотворения (EC 50 = 0,142 мг/л). Более высокие концентрации (5–20 мг/л) приводили к высокой эмбриотоксичности/задержке развития. При концентрациях \cong EC 50 PS-NH₂ влиял на формирование оболочки, как показали оптическая и поляризованная световая микроскопия. Были оценены условия транскрипции 12 генов, участвующих в разных биологических процессах. Пониженные уровни мРНК для ABC-транспортера р-гликопротеина-ABCВ и лизоцима также отмечены через 48 ч после оплодотворения. Наблюдения с помощью сканирующей электронной микроскопии подтвердили токсичность развития при более высоких концентрациях (5 мг/л). Эти данные подчерки-

вают чувствительность ранних эмбрионов *Mytilus* к PS-NH 2 и подтверждают гипотезу о том, что личинки морских моллюсков особенно уязвимы к абиотическим стрессорам, включая отдельные типы НЧ (Balbi et al., 2017).

Было исследовано влияние эффектов аминокислотомодифицированных полистирольных НЧ (PS-NH 2) на гемоциты *Mytilus galloprovincialis in vitro* (Canesi et al., 2016). Результаты исследования показали, что в присутствии НЧ PS-NH 2 увеличиваются клеточное повреждение и продукция ОФК по отношению к среде ASW. Эффекты, по-видимому, опосредованы нарушением регуляции передачи сигналов p38 MAPK. Образование PS-NH 2-протеиновой короны в НЧ исследовали центрифугированием, 1D-гель-электрофорезом и нано-ВЭЖХ-ESI-MS/MS. В результате определили предполагаемый белок C1q, содержащий домен (MgC1q6), как единственный компонент короны жесткого белка PS-NH 2 в лимфе *Mytilus* (Canesi et al., 2016).

Токсичность наночастиц зависит от многих факторов, включая размер, форму, химический состав, площадь поверхности и поверхностный заряд. Серебряные наночастицы попадают в водные экосистемы из-за их обширного применения и представляют собой проблему для здоровья людей и водных видов. Это было показано на пресноводной улитке *Lymnaea luteola* для исследования острой токсичности и генотоксичности наночастиц серебра. Было выявлено, что наночастицы серебра вызывали значительное снижение глутатиона, глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы с сопутствующим увеличением уровня малонового диальдегида и каталазы в пищеварительной железе *L. luteola*. Эти результаты показывают, что наночастицы серебра являются летальными для пресноводных улиток *L. luteola* (Ali et al., 2014).

Золотые наночастицы (Au НЧ) могут применяться в доставке лекарств, диагностике и терапии рака, в пищевой промышленности и восстановлении окружающей среды. Однако мало известно об их потенциальной токсичности. В кратковременном эксперименте оценивалось воздействие Au НЧ (средний диаметр $5,3 \pm 1,0$ нм) в течение 24 ч на мидии (*Mytilus edulis*). В основном золотые наночастицы

накапливались в пищеварительной железе, а также вызывали увеличение перекисного окисления липидов. Это исследование показывает, что *M. edulis* является подходящим модельным животным для исследований токсичности наночастиц в окружающей среде (Tedesco et al., 2010).

За последние годы синтез гибридных наноматериалов значительно возрос благодаря их особым физическим и химическим свойствам. Однако информация об экологической токсичности, связанной с этими химическими веществами, ограничена, особенно в водной среде. Был проведен эксперимент, в котором морской двустворчатый моллюск *Ruditapes decussatus* экспонировался в течение 14 дней в двух концентрациях наночастиц Au-ZnO (50 и 100 мкг/л). Стабильность и устойчивость наночастиц Au-Zn в естественной морской воде оценивали путем объединения просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеивания света. Полученные результаты показывают, что наночастицы Au-ZnO индуцируют биохимические и гистологические изменения в тканях пищеварительной железы и жабр при высокой концентрации. Это было обусловлено значительным увеличением концентрации H_2O_2 , супероксиддисмутазы и каталазы и малонового диальдегида. Кроме того, токсичность наночастиц Au-ZnO была связана с увеличением внутриклеточного уровня железа и кальция в обеих тканях. Гистологические изменения в жабрах и пищеварительной железе были более выражены при дозе 100 мкг/л (Sellami et al., 2017).

Также изучалась токсичность и других видов углеродных наночастиц, таких как C_{60} фуллерены, на морских мидиях *Mytilus* sp. C_{60} фуллерены (в дозировке 0,10–1,0 мг/л) и флуорантен (32–100 мкг/л) экспонировали в течение 3 дней как отдельно, так и в комбинации. Первые два эксперимента были проведены путем воздействия на организм различных концентраций C_{60} и отдельно флуорантена, чтобы определить влияние на общие уровни глутатиона (как показатель общего окислительного стресса), генотоксичность (разрывы ДНК-цепи), гистопатологические изменения в разных тканях (мышцы, пищеварительная железа и жабы) и физиологические эффекты. В третьем эксперименте изучалось комбинированное воздействие C_{60} и флуорантена (соответственно 0,10 мг/л и 32 мкг/л). Как флуорантен, так и C_{60} сами по

себе вызывали зависящее от концентрации увеличение разрывов нитей ДНК. C_{60} и флуорантен усиливали количество разрывов нитей ДНК вместе с 2-кратным увеличением общего содержания глутатиона. Кроме того, значительное накопление C_{60} наблюдалось во всех органах с самыми высокими уровнями в пищеварительной железе ($24,90 \pm 4,91$ мкг). Интересно отметить, что при гистологическом исследовании наблюдались явные признаки аномалий в мышцах, пищеварительной железе и жабрах (Al-Subiaí et al., 2012).

Были оценены эффекты воздействия двух типов наночастиц CoCr, синтезированные методом трибометра (30 нм) и по технологии горячей плазмы (20, 35 и 80 нм) *in vitro* на фибробласты. Исследование показало, что ионы металлов высвобождались с поверхности наночастиц, в частности из более крупных (80 нм) частиц (Raghunathan et al., 2013). Воздействие наночастиц CoCr на фибробласты вызывало быструю (в течение 2 ч) генерацию АФК. Также были зафиксированы повышение уровня анеуплоидии хромосом, фрагментация митохондрий и повреждение цитоскелета, в частности сети микротрубочек. Эти результаты показывают, что клетки проявляют разнообразные митохондриальные АФК-зависимые и независимые ответы на частицы CoCr и что размер наночастиц и количество выделяемого иона металла влияют на токсический эффект (Raghunathan et al., 2013).

Взаимодействие углеродных нанотрубок с важной частью врожденной иммунной системы необходимо учитывать при планировании их использования в биомедицинских целях. Также изучалась реакция иммунной системы на углеродные наночастицы (Bhattacharya et al., 2013). Работа показала, что нейтрофилы и эозинофилы способны к ферментативной деградации углеродных нанотрубок с уменьшением провоспалительного и профиброзного эффектов нанотрубок, тем самым подчеркивая, что воспаление может быть как положительным, так и отрицательным ответом (Bhattacharya et al., 2013).

В исследовании Prakash с соавторами (2011) основное внимание уделяется используемым в настоящее время наногибридным материалам, полимерным наночастицам и нанотрубкам, которые демонстрируют большой потенциал в качестве эффективных систем доставки лекарств для лечения рака, поскольку они могут

быть функционализированы с помощью клеточных рецепторов и внутриклеточных целевых молекул для целенаправленной доставки терапевтических средств. Изучением доставки лекарств с помощью углеродных нанотрубок для лечения рака оценивались и другими исследователями (Yang et al., 2011; Kesharwani et al., 2012).

Рыбы

Оценка токсичности наночастиц TiO_2 проводилась на морских рыбах *Trachinotus carolinus*. Рыба получала две разные дозы – 1,5 и 3,0 мкг наночастиц $\text{TiO}_2 \text{ g}^{-1}$ путем внутрибрюшинной инъекции. Образцы крови собирали для анализа жизнеспособности эритроцитов с использованием теста исключения Trypan Blue (Vignardi et al., 2015). Было обнаружено, что наночастицы TiO_2 не вызывают гибель мальков *T. carolinus*. Однако они вызывали генотоксичность эритроцитов этого вида, что приводило к повреждению ДНК и приводило к образованию микроядер и других аномалий эритроцитов. Образование ядерных аномалий было зависимым от дозы и времени. Наночастицы TiO_2 обладают потенциалом цитотоксичности и могут индуцировать поглощение клетками в исследуемых тканях, таких как почка, печень, мышцы и жабры. Эти данные подтверждаются и другими исследованиями на мальках карпа *Cyprinus carpio* (Hao et al., 2009).

Алюминий накапливался в тканях печени рыб *Oreochromis mossambicus*, подвергшихся действию наночастиц Al_2O_3 (Murali et al., 2017). Снижение массы печени и значений HSI явно влияет на дегенерацию тканей печени. Это было дополнительно подтверждено посредством структурного анализа гистопатологией тканей печени (Murali et al., 2017).

Для исследования токсичности (цито- и генотоксичности) наночастицы серебра (наносферы диаметром 30 нм) использовали клеточную линию *Oryzias latipes* (Wise et al., 2010). Обработка клеточных линий в концентрациях 0,05, 0,30, 0,50, 3,0 и 5,0 мкг/см² индуцировали выживаемость соответственно 80,0, 45,7, 24,3, 1,0 и 0,1 %. Эти данные показывают, что наночастицы серебра являются цито- и геноток-

сичными для клеток рыб. Изучение токсичности наночастиц серебра также проводилось на других клеточных линиях рыб: линия клеток сердца *Catla catla* (SICH), жабр *Catla catla tla* (ICG), личинки *Labeo rohita* (LRG) (Taju et al., 2014).

Воздействие наночастиц ZnO изучали на рыбах *Cyprinus carpio* (Hao, Chen 2012). Наблюдались изменения в активности антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT) и глутатионпероксидазу (GPx). Содержание ферментативного антиоксидантного восстановленного глутатиона (GSH) и уровни перекисного окисления липидов (LPO) в жабрах, печени, головном мозге и кишечнике *C. carpio* оценивались после воздействия различных концентраций (0,5, 5,0 и 50,0 мг/л) раствора наночастиц ZnO на 1, 3, 7, 10 и 14 дней. Наблюдалась тенденция изменения антиоксидантных защитных систем и уровней элементов системы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Более значимое увеличение концентрации до 50,0 мг/л и времени воздействия наночастиц ZnO вызывало значительное снижение активности нескольких ферментов и содержание GSH и увеличение уровня LPO (Hao, Chen 2012).

Рыбки *Characiformes*, подвергавшиеся воздействию наночастиц TiO₂, показали генотоксичность в жабрах, почках и мозге, вероятно, из-за способа воздействия, использованного в этом исследовании (Vicari et al., 2018). Жабры особенно пострадали от наночастиц оксида титана, адсорбция которого в эпителии может быть причиной повреждения, нанесенного вышеперечисленным органам. Почки и мозг, однако, также могут быть целевыми органами. Что касается почек, если будет подтверждено, что через нее выводятся наночастицы, мы сможем определить повреждение, нанесенное этому органу. Также данные свидетельствуют о том, что наночастицы TiO₂ могут влиять на центральную нервную систему некоторых организмов (Vicari et al., 2018).

Известно о накоплении наночастиц TiO₂, внутренне секвестрированном в клетках рыб из-за загрязнения окружающей среды и, таким образом, показывающем, что высокие уровни наночастиц TiO₂ в атмосферных ТЧ и отложениях влияют на биоту (Souza et al., 2019). Локализация наночастиц TiO₂ в цитоплазматических

везикулах и в ядре клеток указывает на возможный путь секвестрации и детоксикации, но это требует дальнейших исследований для оценки доступности наночастиц TiO_2 для клеточных процессов. Более того, следуя полученным результатам, демонстрирующим присутствие наночастиц TiO_2 в мышцах рыб, необходимы дальнейшие исследования, чтобы продемонстрировать, усваивают ли животные, используемые в аквакультуре и сельском хозяйстве, все более активно поступающие в рацион человека наночастицы TiO_2 . Если это так, то это является важной для общественного здравоохранения и экологии проблемой (Souza et al., 2019).

Следующее исследование показало, что карбоксилированный CdSe/ZnS КТ образуют агрегаты в воде, используемой для инкубации эмбрионов (Rotomskis et al., 2018). Агломераты КТ также наблюдаются на поверхности эмбрионов рыб. Они могли образоваться из-за взаимодействия между КТ и слизью, выделяемой эмбрионами. На основе спектроскопических и микроскопических исследований эмбрионов рыб *in vivo* и гистологических образцов и трехмерной реконструкции по результатам конфокальной микроскопии эмбрионов рыб изучался процесс взаимодействия КТ с эмбрионами, их накопление в хорионе зародышей и частичная дезинтеграция мембраны эмбрионов. Хорион эмбрионов привлекал агрегаты КТ, так что агрегаты КТ и/или образованные агломераты со слизью вшивались в хорион эмбриона и вызывали нарушение некоторых частей хориона и могли нарушить целостность хориона после 10–12 дней воздействия КТ. Однако агрегаты КТ не перемещались в перивителлиновое пространство зародышей радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), рыбок данио (*Danio rerio*) или жемчужных гурами (*Trichogaster leerii*). Таким образом, можно утверждать, что хорион эмбрионов радужной форели, рыбок данио и жемчужных гурами является защитным барьером против КТ (Rotomskis et al., 2018).

Исследования показывают, что наночастицы Ag накапливаются в жабрах, печени и головном мозге, что в конечном итоге приводит к окислительному повреждению мозга и печени (Vacchetta et al., 2017). Эритроциты крови рыб, подвергшихся воздействию более высоких концентраций, также показали повреждение

ДНК. Вероятно, что окислительный стресс действует как токсикологический механизм наночастиц Ag у рыб. Эти данные также показывают, что наночастицы серебра являются цитотоксичными и генотоксичными для клеток рыб.

Исследование токсичности на рыбках *Danio rerio* показало, что наночастицы серебра ингибируют эмбриональный эритропоэз (Cui et al., 2016), а также оказывают гепатотоксическое действие (Choi et al., 2010). При исследовании сублетальных эффектов наночастиц Ag и растворенного Ag на радужной форели *Oncorhynchus mykiss* было выявлено, что токсичность Ag будет различаться в зависимости от присутствия наночастиц Ag и агрегатов. Хотя ионное Ag вызывает мобилизацию металлов и окислительный стресс, наночастицы серебра воздействуют другим образом – воспалением и денатурацией белка (UBA и TUBA) (Gagné et al., 2012).

Исследование токсичности наночастиц CuO и CuSO₄ на радужной форели *Oncorhynchus mykiss* выявило накопление меди в жабрах, почках и печени, также наблюдался гемолиз под воздействием CuSO₄ (Isani et al., 2013).

Другие ученые (Rocco et al., 2015) провели исследование генотоксичности наночастиц TiO₂ *in vivo* у рыбок *Danio rerio*. После 2 нед. адаптации группы рыбок *D. rerio* подвергались воздействию НЧ TiO₂ (1 и 10 мкг/л) в течение 5, 7, 14, 21 и 28 дней. Наночастицы TiO₂ индуцируют повреждение ДНК только для самой высокой концентрации (10 мкг/л) и только в течение 14 и 21 дня. Результат особенно интересен тем, что концентрации, используемые для исследования, очень близки к концентрациям, обнаруженным в окружающей среде. Наконец, для правильного и детального понимания генотоксических эффектов n-TiO₂ необходимо учитывать множественные взаимодействия, которые могут иметь наночастицы с другими загрязняющими веществами и молекулами, растворенными в водной среде. Эти данные подтверждаются и другими исследованиями. Влияние размера частиц на окислительный стресс на воздействие наночастиц диоксида титана (TiO₂ НЧ) на *Daphnia magna* было исследовано как при острых, так и в хронических тестах на токсичность. Оценивалась активность четырех антиоксидантных ферментов: ката-

лазы (CAT), супероксиддисмутазы (SOD), глутатионпероксидазы (GPX) и глутатион-S-трансферазы (GST). Биохимические измерения показали, что воздействие наночастиц диоксида титана значительно увеличивало активность антиоксидантных ферментов в *D. magna*. CAT, GPX и GST, но не SOD, показали увеличение, зависящее от концентрации. Повышенная смертность при концентрации 5 мг/л в хроническом эксперименте объясняется накоплением наночастиц TiO₂ в кишечнике *D. magna*, которые могут вызывать такие эффекты, как окислительный стресс, связанные с индукцией антиоксидантных ферментов (Kim et al., 2010; Fan et al., 2016).

Одним из наиболее значительных и в настоящее время недостаточно понятных рисков НМ является их потенциальная передача и увеличение в пищевых цепях. Для решения этой проблемы была создана упрощенная модель пресноводной пищевой цепи, включая организм с низким трофическим уровнем (дафния, *Daphnia magna*) и организм с высоким трофическим уровнем (рыбки данио, *Danio rerio*). Наноразмерные частицы TiO₂ (nTiO₂) могут переноситься из *D. magna* в *D. rerio* через пищу (Zhu et al., 2010).

Млекопитающие

Было оценено действие наночастиц кремнезема на сердечно-сосудистую систему млекопитающих *in vitro* и *in vivo* (Duan et al., 2013). Стоит отметить, что наночастицы кремнезема индуцировали цитотоксичность, а также окислительный стресс и апоптоз. ОФК и апоптоз считались основным фактором дисфункции эндотелиальных клеток, участвующих в нескольких молекулярных механизмах сердечно-сосудистых заболеваний. *in vivo* измеряли смертность, мальформацию, сердечный ритм и клеточную смерть целых эмбрионов у эмбрионов рыбок данио. Результаты показали, что наночастицы кремнезема индуцируют токсичность перикардии и вызывают брадикардию. Наночастицы кремнезема ингибировали экспрессию p-VEGFR2 и p-ERK1/2, а также понижают регуляцию MEF2C и NKX2.5. Это свидетельствует о том, что наночастицы кремнезема могут ингибировать ангиогенез и нарушать образование и развитие сердца. Воздействие наночастиц

кремнезема является возможным фактором риска для сердечно-сосудистой системы (Duan et al., 2013).

В исследовании Cho с соавторами (2009a) меченую флуоресцентным красителем суспензию частиц двуокиси кремния размером 50, 100 и 200 нм внутривенно вводили мышам для идентификации токсичности, распределения в тканях и экскреции наночастиц кремнезема *in vivo*. Выраженный воспалительный ответ был при введении наночастиц кремнезема размерами 200 и 100 нм, но не было значительного ответа при инъекции частиц размером 50 нм. Частицы кремнезема 50, 100 и 200 нм выводились с помощью мочи и желчи. Наночастицы кремнезема были захвачены макрофагами в селезенке и печени и оставались там до 4 нед. после однократной инъекции (Cho et al., 2009a).

Есть данные, что наночастицы TiO_2 усиливают токсическое действие других загрязнителей. Был исследован комбинированный эффект наночастиц TiO_2 (n- TiO_2) и As (V). Высокие концентрации As (V) могут накапливаться на поверхности n- TiO_2 . Токсичность испытывали на *Ceriodaphnia dubia*: 1) n- TiO_2 суспензии; 2) As (V) растворы и 3) смеси суспензий n- TiO_2 и As (V). Результаты исследования показали, что только n- TiO_2 нетоксичен, когда концентрация составляет менее 400 мг/л. Однако в присутствии низких концентраций n- TiO_2 токсичность As (V) значительно возрастала. При той же начальной концентрации As (V) токсичность n- TiO_2 сначала увеличивалась, достигла максимума, а затем уменьшалась с увеличением концентрации n- TiO_2 (Wang et al., 2011).

Исследователи приводят интересные выводы о влиянии наночастиц на животных при их ингаляционном способе поступления в организм. Так, после ингаляции у подопытных животных углеродные наночастицы в крови определялись уже через 1 мин., вызывая агрегацию тромбоцитов, стимулируя сосудистый тромбоз в каротидных артериях крыс (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Халлиулин и др., 2013). Помимо этого упоминается, что воздействие одностенных углеродных нанотрубок способно вызывать увеличение атеросклеротических бляшек в крупных сосудах (Халлиулин и др., 2013). На высокий уровень задержки наночастиц в легких и способность проникать через аэрогематический барьер указывают некоторые работы (Величковский,

2009), хотя другие авторы описывают, что в крови добровольцев, вдыхавших наноаэрозоль в течение 6 ч, углеродные нанотрубки не обнаруживались (Халлиулин и др., 2013).

У грызунов, подвергшихся кратковременным экспозициям, углеродные нанотрубки способствуют развитию в легочной ткани воспаления (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Рыбалкин и др., 2013; Халлиулин и др., 2013), фиброза и гранулем (Халлиулин и др., 2013; Andón et al., 2013). Углеродные наноматериалы также благодаря своим уникальным физическим, химическим и биологическим свойствам в настоящее время считаются перспективными кандидатами на применение в регенеративной медицине (Fraczek-Szczypta 2014). В другой работе была оценена биосовместимость нановолокон из хлопковой целлюлозы (УНВ) и карбоксилированных многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ-СООН) путем оценки эмбрионального развития, экспрессии генов (биомаркеры, ориентированные на клеточный стресс, апоптоз и тотальность) и апоптоза в эмбрионах крупного рогатого скота *in situ*. Воздействие наночастиц не мешало развитию бычьего эмбриона, но влияло на экспрессию гена (Munk et al., 2016).

Флуоресцентный наноалмаз (ФНА), содержащий центры свободного азота в качестве встроенных флуорофоров, является новым дополнением к наноуглеродному семейству. Была изучена стабильность и биосовместимость ФНА 100 нм у крыс с помощью внутрибрюшинной инъекции в течение 5 мес., и предложено потенциальное применение этого биоматериала для картирования регионального лимфатического узла в модели мыши как из *in vivo*, так и из *ex vivo*. Внутрикожно вводимые частицы ФНА накапливались в подмышечных лимфатических узлах обработанных мышей. Гистопатологическое исследование различных тканей и органов показало, что ФНА нетоксичны, даже при дозе 75 мг/кг массы тела (Vaijayanthimala et al., 2012).

Есть данные, указывающие на то, что углеродные нанотрубки могут оказывать генетическое, зависимое от фона токсическое воздействие на нормальное развитие эмбрионов мышей. Исследование молекулярного механизма показало, что многослойные углеродные нанотрубки непосредственно вызвали p53-зависимый

апоптоз и остановку клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК (Huang et al., 2014). Целью другого исследования было изучение воздействия однослойных углеродных нанотрубок на клетки полости рта *in vitro*. Фибропласты подвергли воздействию ОУНТ в дозах 50, 75, 100, 125, 150 мкг/мл в течение 24 ч. ОУНТ генерировали генотоксические эффекты во всех дозах. Кроме того, была доказана способность этих наноматериалов индуцировать окислительный стресс и экспрессию Hsp70 (Cicchetti et al., 2011).

Что касается влияния углеродных наночастиц при попадании через желудочно-кишечный тракт, то некоторые авторы высказывают гипотезу об этиологии болезни Крона и неспецифического язвенного колита, что может быть связано, в частности, с попаданием наночастиц в кишечник человека (Зиганшин, Зиганшина, 2008). Установлено и токсическое дозозависимое влияние УНМ «Таунит» на состояние внутренних органов самок лабораторных мышей. Это влияние проявлялось в увеличении массы желудочно-кишечного тракта, матки, яичников, легких, печени, сердца по мере возрастания дозы (Горшенева, 2014), а при исследовании токсичности многослойных углеродных нанотрубок при интраперитонеальном введении мышам обнаруживались фиброзное утолщение брюшины и опухоли. Основными причинами смерти животных были названы мезотелиомы и непроходимость кишечника из-за фиброзных изменений в брюшине (Халлиулин и др., 2013).

Нами исследовано влияние многослойных углеродных нанотрубок на эпителиоциты разных отделов желудочно-кишечного тракта и уротелий разных отделов нефрона почки мышей линии СВА (Golokhvast et al., 2013). В частности, отмечена генерализованная реакция иммунной системы организма мыши на пероральное введение нанотрубок, реализующаяся за счет гипертрофии лимфоидных структур в собственной пластинке слизистой оболочки ЖКТ, фолликулов в капсуле и паренхиме почки, а также гипертрофией Мальпигиевых телец белой пульпы селезенки. Гипертрофия лимфоидной ткани в стенке желудочно-кишечного тракта и в селезенке, по нашему мнению, является реализацией индукции иммунного ответа эпителиоцитами не только как неспецифическая реакция на повышение секреторной активности железистого эпителия, но и как развитие индуцированной миграции лимфоцитов на

антиген-представляющие взаимодействия эпителиоцитов с эффекторными иммунными клетками. В целом можно отметить, что многослойные углеродные нанотрубки не оказывают выраженного токсического действия на организм мышей линии СВА при кратковременном эксперименте. Несмотря на это, стоит отметить некоторую иммуногенность наноматериала и увеличение миграционной активности клеток, проявляющейся в лимфоидной инфильтрации (Голохваст и др., 2010).

Стоит отметить интересное исследование воздействия наночастиц диоксида кремния на клетки эпителия бронхов Beas-2В. Окислительный стресс, индуцированный наночастицами на основе диоксида кремния, оценивали путем изучения образования АФК и индукции антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD) и гемоксигеназа-1(НО-1). Наночастицы кремнезема проявляли токсичность через окислительный стресс (Hamilton et al., 2008; Eom, Choi, 2009; Park, Park, 2009).

Есть работа, в которой отмечается, что при применении имплантантов из УНМ «Таунит» в тканях животных отсутствовали выраженные воспалительные реакции, а скорость регенерации костной ткани была выше обычной (Саркисян и др., 2014). Есть данные, что больше всего от последствий токсического действия наноматериалов страдают головной мозг, костный мозг, репродуктивные и выделительные органы (Каркищенко, 2009).

Известны интересные исследования влияния многостенных нанотрубок на репродуктивную систему нелинейных лабораторных мышей. Так, А.А. Гусев с соавторами (2010) описывают, что прием мышами коллоидного водного раствора наноматериала в дозировке 30 мг/кг привел к бесплодию у самцов, а вот у самок негативного влияния на репродуктивную систему не зафиксировано, наоборот, это стимулировало повышение их плодовитости. В другом источнике сообщается, что нанотрубки способны изменять гормональный фон, увеличивать количество потомства, при этом отмечается эмбриональная гибель, но без влияния на общую летальность животных (Васюкова и др., 2014).

Считается, что углеродные НМ, как углеродные нанотрубки и углеродные нановолокна, обеспечивают благоприятную внеклеточную среду для адгезии клеток из-за их сходного размера с натуральным коллагеном. Исследования показали, что УНТ и УНВ могут избирательно стимулировать адгезию клеток, связанных с костями (т.е. остеобластов и мезенхимальных стволовых клеток), одновременно снижая адгезию клеток, таких как фибробласты и хондроциты. Однако углеродные материалы по своей природе являются биоинертными, имеют остеопрободимость, но не имеют остеоиндуктивности. Эффективным способом улучшения биологических свойств является объединение УНТ/УНВ с биологически активными соединениями, такими как соединения CaP (Cai et al., 2013). Эти данные подтверждаются и другими исследованиями, где многослойные углеродные нанотрубки использовались как каркас для клеточной линии C2C12 (мышь) *in vitro* (Abarrategi et al., 2008). Также были проведены исследования для оценки использования углеродных нанотрубок для ускорения остеосинтеза при травме кости (Newman et al., 2013).

Также изучалось влияние многослойных углеродных трубок на дыхательную систему, на аллергические воспаления дыхательных путей *in vivo* и их клеточные механизмы *in vitro*. *In vivo* мыши ICR были разделены на 4 экспериментальные группы. Изучали клеточность бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), гистологию легких, уровни цитокинов, связанных с аллергическим воспалением в легких гомогенатах легких/БАЛ, и уровни иммуноглобулина в сыворотке. Кроме того, было оценено влияние МУНТ (0,1–1,0 мкг/мл) на фенотип и функцию дендритных клеток костного мозга (DC) *in vitro*. МУНТ усугубляет аллерген-индуцированное воспаление дыхательных путей, характеризующееся инфильтрацией эозинофилов, нейтрофилов и мононуклеарных клеток в легких, а также увеличением количества бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии (Inoue et al., 2009).

Оценка токсичности УНТ на дыхательную систему была проведена Kayat с соавторами (2011) и Wang с соавторами (2016). Показано, что УНТ токсичны и что степень этой токсичности зависит от свойств УНТ, таких как структура (одиночная стенка или множественная стена), отношение длины и размеров, площадь поверхности, степень агрегации, степень окисления, связанные функциональные группы,

способ производства, концентрации и дозы. Люди могут подвергаться воздействию УНТ либо случайно, вступая в контакт с аэрозольной формой УНТ во время производства, либо подвергаясь воздействию в результате биомедицинского использования. Многочисленные исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что УНТ и/или связанные с ними загрязняющие вещества или каталитические материалы, которые возникают в процессе производства, могут вызывать окислительный стресс, воспаление легких, апоптоз в разных типах клеток и индукцию цитотоксического воздействия на легкие (Kayat et al., 2011; Wang et al., 2016). Другие исследования показывают, что воздействие многослойных углеродных нанотрубок индуцирует окислительный стресс за счет снижения общей антиоксидантной способности у крыс (Reddy et al., 2011).

В работе Frank с соавторами (2017) линии мышей (BALB/c, C57Bl/6, DBA/2 и C3H/He) подвергались воздействию УНТ с помощью орофарингеальной аспирации, а гистология легких и образцы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) оценивали в течение 28 дней с целью определения чувствительности/резистентности между штаммами. Влияние воздействия на гены, регулирующие различные аспекты иммунного ответа и выживаемость клеток, было ограничено у мышей DBA/2 по сравнению с C57Bl/6. Исследование гибридов B6D2F1 (C57Bl/6×DBA/2) продемонстрировало наследование чувствительности к воздействиям УНТ в отношении токсикологической патологии легких и накоплений лейкоцитов БАЛ (Frank et al., 2017).

Исследование Behl с соавторами (2013) показало, что свиные фибробласты и эпителиальные клетки различаются по их реакции на наночастицы и ионы CoCr. Установлено, что клинически значимые частицы CoCr при объемах $6,05 \text{ мкм}^3$, $60,50$ и $121,0 \text{ мкм}^3$ на клетку после 1 дня культивирования значительно уменьшают жизнеспособность эпителиальных клеток, но не фибробластов. Кроме того, наночастицы CoCr индуцировали секрецию IL-8 из фибробластов при объеме частиц $121,0 \text{ мкм}^3$ на клетку и на эпителиальные клетки при объемах частиц $60,5$ и $121,0 \text{ мкм}^3$. Оба типа клеток также индуцировали образование активных форм кислорода при

обработке их частицами в дозе 50 мкм^3 в течение 24 ч. Однако различие в восприимчивости двух типов клеток к активным формам кислорода может объяснить разницу в их реакции на токсичность, вызванную частицами (Behl et al., 2013).

Было описано, что вводимые перорально НЧ серебра поглощаются в диапазоне 0,4–18,0 % у млекопитающих (Hadrup, Lam, 2014). В коже серебро вызывает сине-серое обесцвечивание, называемое аргирия. Экскреция происходит через желчь и мочу. Сообщалось о следующих дозозависимых результатах токсичности у животных: смерть, потеря массы, гипоактивность, измененные уровни нейротрансмиттеров, измененные ферменты печени, измененные значения крови, увеличение сердца и иммунологические эффекты (Hadrup, Lam, 2014).

При изучении токсического действия наночастиц Al_2O_3 , SiO_2 и ZrO_2 на эритроциты крыс *Wistar in vitro* с использованием атомно-силовой микроскопии и флуоресцентного анализа было выявлено преобразование дискоцитов в эхиноциты и сфероциты, вызванное наночастицами оксида металла (Kozelskaya et al., 2016). Показано, что только чрезвычайно высокая концентрация наночастиц (2 мг/мл) позволяет правильно оценить их влияние на морфологию клеток. Кроме того, выяснилось, что изменения мембран эритроцитов, обработанных наночастицами, начались задолго до морфологических модификаций клеток. Напротив, отрицательно заряженные наночастицы ZrO_2 и SiO_2 не влияли на микровязкость до концентрации соответственно 1,0 мкг/мл и 0,1 мг/мл. В свою очередь, положительно заряженные наночастицы Al_2O_3 индуцировали структурные изменения липидного бислоя эритроцитов уже в концентрации 0,05 мкг/мл. Было показано уменьшение микровязкости оболочек эритроцитов, обработанных наночастицами Al_2O_3 и SiO_2 . Обнаружено, что взаимодействие наночастиц ZrO_2 с клетками привело к увеличению микровязкости мембраны и разрывам набухших эритроцитов (Kozelskaya et al., 2016).

Углеродные нанолуковицы (УНЛ) представляют собой новый класс наночастиц, который обладает большим потенциалом в ряде различных применений. Функционализация УНЛ с различными функциональными группами улучшает их растворимость и биосовместимость, что приводит к повышенной способности про-

никать в клетки. Кроме того, их малый размер и высокая площадь поверхности позволяют конъюгировать различные диагностические и терапевтические агенты, открывая новые возможности в приложениях с использованием ананасизма (Camisasca, Giordani, 2017; Mykhailiv et al., 2017).

Подобные исследования проводились на клеточной линии эпителия бронхов человека BEAS-2B. Цитотоксичность МУНТ была выше, чем у цирколитового асбеста в клетках BEAS-2B. IC 50 МУНТ составлял 12 мкг/мл, тогда как концентрация асбеста (крокидолита) – 678 мкг/мл. Результаты анализа репортерного гена с использованием промотора NF-κB или AP-1, связанного с геном люциферазы в транзиторно трансфицированных клетках CHO-K1, показали, что NF-κB активировался после воздействия МУНТ, тогда как AP-1 не изменялся (Hirano et al., 2010), что подтвердили и последующие исследования (Matthews et al., 2013).

Целью другого исследования было оценить цитотоксичность, окислительный стресс, апоптоз и провоспалительный медиатор, индуцированные наночастицами ZnO на клетках LoVo карциномы толстой кишки человека (De Berardis et al., 2010). Биологическая активность этих частиц была связана с их физико-химическими характеристиками. Физико-химические характеристики оценивали с помощью аналитической электронной микроскопии. Экспериментальные данные показывают, что окислительный стресс может быть ключевым путем для индуцирования цитотоксичности наночастиц ZnO в клетках карциномы толстой кишки. Более того, изучение взаимосвязи между токсикологическим эффектом и физико-химическими характеристиками частиц предполагает, что площадь поверхности не играет перво-степенной роли в цитотоксичности (De Berardis et al., 2010).

Были исследованы эффекты наночастиц кремния 20 и 50 нм на культивируемые клетки человеческой эмбриональной почки (HEK293) (Wang F., 2009). Оценки жизнеспособности клеток, митохондриальной функции, морфологии клеток, реакционноспособных видов кислорода (ОФК), глутатиона (GSH), реактивного вещества тиобарбитуровой кислоты (TBARS), клеточного цикла и апоптоза определяли под контролем и подвергали воздействию диоксида кремния. Воздействие наноча-

стиц SiO₂ на 20 или 50 нм при дозах между 20 и 100 мкг/мл снижало жизнеспособность клеток дозозависимым образом. (LD₅₀) 24-часового воздействия составляла 80,2 ± 6,4 и 140,3 ± 8,6 мкг/мл соответственно для 20 и 50 нм наночастиц SiO₂. Морфологическое исследование показало сморщивание клеток и ядерную конденсацию после воздействия наночастиц SiO₂. Увеличение внутриклеточного уровня ОФК и снижение содержания GSH наблюдалось также в клетках HEK293, подверженных воздействию наночастиц SiO₂. Увеличение количества TBARS показало повышенный уровень перекисного окисления липидов. Проточная цитометрия показала, что наночастицы SiO₂ могут приводить к остановке фазы G₂/M и апоптозу суб-G₁ дозозависимым образом. Таким образом, воздействие наночастицы SiO₂ приводило к дозозависимой цитотоксичности в культивируемых клетках HEK293, что было связано с повышенным окислительным стрессом (Wang F., 2009)

Также есть данные, указывающие на то, что наночастицы CeO демонстрируют низкую цитотоксичность против нескольких раковых заболеваний человека (DLD1, DLD1-TxR, NCI-H460, NCI-H460/R) и двух нормальных клеточных линий (кератиноциты HaCaT, фетальные фибробласты легких MRC-5). LD₅₀ был достигнут в испытанных диапазонах концентраций только в двух из восьми используемых клеточных линий, меланомы 518A2 и колоректальной аденокарциномы HT-29 (Pešić et al., 2015).

Было продемонстрировано, что положительно заряженные наночастицы кремнезема поглощаются в виде агрегатов человеческими дермальными фибробластами, растворяются внутриклеточно в течение одной недели и выделяют в виде как коллоидов, так и растворов (Quignard et al., 2012). Эти явления наблюдаются для больших (> 40 нм) частиц, не влияя на клеточную активность. Меньшие частицы, как отрицательно, так и положительно заряженные, также экстенсивно агрегируются снаружи и внутри клеток, вызывая большие отрицательные эффекты на жизнеспособность фибробластов и даже генотоксические эффекты (Quignard et al., 2012).

В целом наночастицы золота признаны нетоксичными. Тем не менее были некоторые сообщения об их токсичности, которая, как было показано, зависит от

физического размера, поверхностной химии и формы наночастиц (Cho et al., 2009). Было проведено исследование токсичности с использованием наночастиц золота размером 13 нм с покрытием PEG (MW 5000) *in vivo*. Обнаружено, что такие наночастицы золота индуцируют острое воспаление и апоптоз в печени. Было также установлено, что эти наночастицы накапливаются в печени и селезенке в течение 7 дней после инъекции. Кроме того, просвечивающая электронная микроскопия показала, что многочисленные цитоплазматические везикулы и лизосомы клеток Куаффера печени и макрофагов селезенки содержали наночастицы золота с покрытием PEG (Cho et al., 2009).

Исследование Saquib с соавторами (2013) продемонстрировало транслокацию наночастиц цинкового феррита ($ZnFe_2O_4$ НЧ) в цитоплазму человеческих амнионных эпителиальных клеток (WISH) и последующую цитотоксичность и генетический ущерб. Результаты исследования показали, что *in situ* НЧ индуцируют окислительный стресс, изменения в клеточной мембране и разрывы нити ДНК. В целом данные показали потенциал $ZnFe_2O_4$ НЧ вызывать клеточную и генетическую токсичность в клетках плацентарного происхождения. Таким образом, значительная продукция ОФК, уменьшение $\Delta \Psi_m$, повреждение ДНК и активация генов, связанных с воспалением, окислительным стрессом, пролиферацией, повреждением ДНК и восстановлением, могут служить в качестве прогнозирующей токсичности и маркеров напряжения для экотоксикологической оценки. $ZnFe_2O_4$ НЧ индуцировали клеточный и генетический ущерб (Saquib et al., 2013).

Другие исследования показывают, что наночастицы ZnO могут, по-видимому, уменьшать потенциал митохондриальной мембраны, увеличивать продукцию ОФК и приводить к избыточной экспрессии каспазы-12 в клетках RGC-5 (что указывает на то, что токсичность ZnO, вызванная наночастицами, через перепроизводство ОФК будет вызывать стресс эндоплазматического ретикулума), приводят к повреждению клеток RGC-5 и, наконец, индуцируют апоптоз/некроз. Сверхэкспрессия каспазы-12 может быть вовлечена в гибель клеток в клетках RGC-5 (Guo et al., 2013).

Исследования Arora с соавторами (2009) показывают, что, хотя наночастицы серебра (СНЧ), по-видимому, проникают в первичные клетки и вызывают окислительный стресс, клеточные антиоксидантные механизмы предотвращают окислительный стресс. При воздействии СНЧ в течение 24 ч морфология первичных фибробластов и первичных клеток печени оставалась неизменной соответственно до 25 и 100 мкг/мл СНЧ, хотя и с незначительным уменьшением слияния. Значения IC_{50} для первичных фибробластов и первичных клеток печени, выявленные методом ХТТ, составляли соответственно 61 и 449 мкг/мл. Предполагаемое использование наночастиц серебра находится в форме актуальной антимикробной гелевой композиции для лечения ожогов и ран (Arora et al., 2009).

Исследовано взаимодействие сферических наночастиц серебра 7–20 нм с первичными фибробластами и первичными клетками печени *in vitro* (Arora et al., 2009). Результаты исследования показывают, что, хотя наночастицы серебра, похоже, входят в эукариотические клетки, клеточные антиоксидантные механизмы защищают клетки от возможного окислительного повреждения (Arora et al., 2009).

Рекомендуется, чтобы каждое применение наночастиц в медицине оценивалось на основе индивидуального подхода до тех пор, пока не будут разработаны конкретные рекомендации (Hofmann-Antenbrink et al., 2015; Jo et al., 2015). Некоторые наноматериалы уже сегодня имеют потенциальное применение в наномедицине в качестве биосовместимых и вспомогательных субстратов и в качестве фармацевтических эксципиентов для создания универсальных систем доставки лекарств (Foldvari, Bagonluri, 2008; Bardi et al., 2009; Tavangarian, Li, 2012; Kafa et al., 2016).

В последнее десятилетие наноматериалы были выделены в качестве перспективных объектов для улучшения традиционных материалов тканевой инженерии. Важно отметить, что это подчеркивает, что наноматериалы обладают превосходными цитосовместимыми, механическими, электрическими, оптическими, каталитическими и магнитными свойствами по сравнению с обычными (или микроструктурированными) материалами. Эти уникальные свойства наноматериалов помогли

улучшить рост разных тканей (Harrison, Atala, 2007; Slowing et al., 2008; Zhang, Webster, 2009; Newman et al., 2013).

Недавно появились данные, которые свидетельствуют о том, что физико-химические свойства НЧ оказывают решающее влияние на их токсичность. Тем не менее существует несколько разногласий относительно биологических эффектов размера НЧ и площади поверхности. В исследовании Hsiao и Huang (2011) использовали шесть самосинтезированных и два коммерческих ZnO и TiO₂ наноматериалов для оценки влияния основных физико-химических свойств НЧ (размер, форма, площадь поверхности, фаза и состав) на клетки эпителия легких человека (A549). Было обнаружено, что меньшие НЧ имеют большую токсичность, чем более крупные, — это отличается от результатов предыдущих исследований (Hsiao and Huang, 2011).

Наноалмазы (НА) являются масштабируемыми транспортными средствами для доставки лекарств, которые обладают высокой загрузочной способностью, возможностью доставки практически любого типа терапевтического и мощного антрациклинового связывания, что уменьшает предварительное зрелое лекарственное элюирование, которое, в свою очередь, может повысить толерантность к лекарственным средствам и снизить токсичность препарата (Xi et al., 2014).

Было также показано, что dND-PG мало влияет на функции клеток макрофага U937, за исключением небольшого увеличения продукции TNF- α в покоящихся макрофагах U937 (He et al., 2016). dND-PG является перспективным лекарственным носителем для реализации высокоселективной доставки лекарств в опухолевые клетки с помощью специфических механизмов поглощения с минимальным поглощением и влиянием на макрофаги (Zhao et al., 2014).

Свойства биофункциональных nDP были исследованы на культивируемых мезенхимальных стволовых клетках человека и на развивающейся куриной эмбрионной хориоаллантаидной мембране (Schimke et al., 2016). В конечном итоге пористый материал для замещения кости был покрыт nDP. Биофункциональный каркас демонстрировал значительно более высокие темпы ангиогенеза уже через месяц

после имплантации. Таким образом, nDP можно использовать для облегчения функционализации синтетических биоматериалов (Schimke et al., 2016).

Большинство наночастиц оказывают негативное воздействие как на живые организмы в целом, так и на отдельные органы и системы. Они вызывают развитие окислительный стресс, повреждение ДНК и оказывают эмбриотоксическое действие.

Влияние наночастиц на бактерии

Токсичность наночастиц ZnO, TiO₂ и CuO оценивалась на бактериях *Vibrio fischeri* в зависимости от размера и растворимости (Heinlaan et al., 2008). Суспензии нано- и микрочастиц TiO₂ были не токсичны даже при дозе 20 г/л. Все образцы Zn были очень токсичны: L(E)C₅₀ мг/л. Токсичность была вызвана растворенными ионами Zn. Соединения Cu с имели разную токсичность. Токсичность по отношению к *V. fischeri* были в значительной степени объяснены растворимыми ионами Cu (Heinlaan et al., 2008).

Неоднократно исследовали эффекты наночастиц Al₂O₃ в широком диапазоне концентраций (10–1000 мкг/мл) на *Escherichia coli*. Средний диаметр наночастиц был определен как 179 нм в водном растворе, а площадь поверхности была определена равной 21,23 м²/г. Было установлено, что концентрация 1000 мкг/мл умеренно ингибирует рост бактерий. Наблюдалась практически незначительная зависимость темпов роста от концентрации наночастиц Al₂O₃. Алюминиевые наночастицы оказывали негативное воздействие на бактерии только при очень высоких концентрациях, что может быть связано с взаимодействием поверхностных зарядов между частицами и клетками (Sadiq et al., 2009). Подобные процессы справедливы для всех типов наноматериалов, в том числе и кремниевых (Rabolli et al., 2011)

В другом исследовании было обнаружено, что наночастицы Ag (0,1, 1,0 и 10,0 мг/кг почвы) уменьшали метаболическую активность почвенных микробов, потенциал нитрификации и количество бактерий и бактерий, окисляющих аммиак; напротив, наночастицы FeO положительно влияли на почвенную микробную метаболическую активность (на 1 и 10 мг/кг почвы) и потенциал нитрификации почвы

(на 0,1 и 1,0 мг/кг почвы). Специфическая микробная метаболическая активность и специфический нитрификационный потенциал далее показали, что наночастицы металлов или оксидов металлов могут изменять циклы С и N сельскохозяйственной почвы, влияя на микробный обмен почв (He et al., 2016).

Результаты исследования (Li et al., 2013) показали, что токсичность нано-ZnO к *Escherichia coli* зависит не только от свободного Zn^{2+} , но также от сосуществующих катионов, которые могут снизить токсичность Zn^{2+} . Повышение pH раствора, HPO_4^{2-} , и DOM уменьшали концентрацию свободного Zn^{2+} , высвобождаемого из нано-ZnO, и, таким образом, снижали токсичность нано-ZnO. Кроме того, как Ca^{2+} , так и Mg^{2+} резко снижали токсичность Zn^{2+} к *E. coli*. Эти данные подчеркивают важность химии воды для оценки токсичности нано-ZnO в природных водах.

Обширное производство и применение магнитных наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (МНЧ) увеличило их потенциальный риск для окружающей среды и здоровья человека. Исследование He с соавторами (2011) иллюстрирует генетическое воздействие магнитных наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (МНЧ) на *Escherichia coli*. После инкубации 3000 поколений с добавлением МНЧ были обнаружены очевидные геномные вариации. Физико-химические взаимодействия между МНЧ и бактериями могут быть причиной таких геномных реакций. Как увеличенный ион Fe^{3+} , так и поглощение МНЧ облегчали связывание Fe с белками и цепями ДНК, что привело к увеличению частоты мутаций *E. coli*.

Субтоксическое действие наночастиц CuO (нано-CuO) оценивали с использованием трех рекомбинантных люминесцентных бактерий *Escherichia coli*, специфически реагирующих на АФК, одноцепочечные разрывы ДНК и биодоступные ионы Cu. Используя эти датчики, было доказано, что нано-CuO индуцирует образование супероксидных анионов, пероксида водорода и одноцепочечной ДНК уже при очень низких субтоксических уровнях (0,1 мг Cu/L) (Bondarenko et al., 2012).

А.А. Гусев с соавторами (2013) указывают на то, что углеродные нанотрубки способны проявлять сильную антимикробную активность. Были получены комплексы на основе материала многостенных углеродных нанотрубок типа «Таунит»

с антибиотиками этамицином А, гризеоовиридином, полимиксином В и тобрамицином. Установлено, что полученные комплексы обладают антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Escherichia coli* (Сейфулла и др., 2008). Также показано, что полученные наноконплексы «Таунит»-нистатин А1 активны в отношении *Aspergillus niger*, а «Таунит»-натамицин активен в отношении *Aspergillus niger* и *Candida albicans* (Тимофеева и др., 2014).

Серебряные наночастицы могут быть классифицированы как высокотоксичные для арктических почвенных бактерий. Последующие культурологические исследования подтвердили, что одна из идентифицированных сообществом бактерий, ассоциируемых с растениями, *Bradyrhizobium canariense*, по-видимому, имеет выраженную чувствительность к серебряным наночастицам. Таким образом, загрязнение наночастицами арктических почв, в частности серебряными наночастицами, вызывает озабоченность. Должны быть разработаны процедуры предотвращения и устранения таких загрязнений (Kumar et al., 2011). В другом исследовании сообщается, что компоненты почвы смягчают антимикробный эффект серебряных наночастиц (Calder et al., 2012).

В новой области нанотехнологий оценка воздействия углеродных нанотрубок (УНТ) и углеродных нановолокон (УНВ) является неотъемлемым компонентом охраны труда и окружающей среды, оценки и управления рисками. Профессиональное воздействие УНТ/УНВ вызывает озабоченность на всех этапах жизненного цикла материала в результате исследований путем их производства и использования. Потребительские и экологические риски оцениваются только по моделированным данным. Доступная информация о последних этапах жизненного цикла этих материалов до сих пор остается неполной относительно количества обрабатываемых материалов и уровней воздействия. Качество и объем информации, доступной для использования и применения УНТ/УНВ, следует улучшить, чтобы обеспечить количественную оценку воздействия этих материалов на человека (Guseva Canu et al., 2016).

Углеродные нанотрубки обладают превосходной механической прочностью, электрической и теплопроводностью. Это делает их подходящим веществом для

разработки медицинских изделий. Кроме того, высокое отношение площади поверхности к объему позволяет использовать их для обнаружения и лечения раковых клеток, нервных расстройств, восстановления тканей и т.д. Но большинство биомедицинских применений УНТ следует использовать после функционализации (Merum et al., 2017).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Используемые частицы и методы изучения их свойств

В эксперимент были взяты цеолиты Люльинского, Вангинского, Куликовского, Холинского и Шивертуйского месторождений. Пробы измельчались согласно нашей методике (Golokhvast et al., 2010), сначала в дробилке ВКДМ-6 (Вибротехника, Россия) до фракции от 1 мм до 20–50 мкм. Часть полученного материала обрабатывалась в ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonopuls 3400 (Bandelin, Италия) до фракции около 5–10 мкм. Следующая фракция получалась после обработки в планетарной мельнице Fritch Pulverisette 4 (Fritch, Германия) до размеров от 1 мкм до 100 нм.

Частицы минералов (10–50 мкм) были получены путем дробления цеолитового туфа Куликовского месторождения в щековой дробилке Fritch (Германия) и просеяны сначала через сито с диаметром ячейки 50 мкм, а затем через вибрационное сито с диаметром 10 мкм, и оставлена средняя порция. Частиц данного размера в пробе было более 85 % (рис. 1).

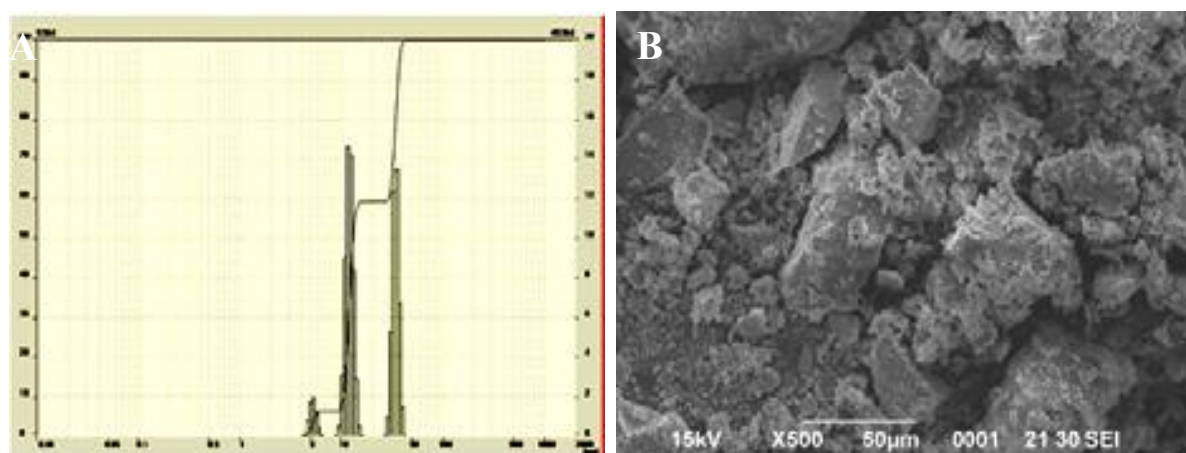


Рис. 1. Гранулометрическая диаграмма и интегральная функция (А) и микрофотография частиц цеолитов под электронным микроскопом (Б). А: ось абсцисс – размер наночастиц, мкм; ось ординат – доля частиц определенного размера. Б: измерительный отрезок – 50 мкм. Увеличение x500

Приготовление нано- и микродисперсных минеральных порошков. Образцы измельчались в планетарной мельнице Fritsch Pulverisette 4 во втором предустановленном режиме в течение 10 мин (измельчение минералов более 10 мин может приводить к сдвигу кристаллической решетки).

Гранулометрический анализ размера частиц минералов проводили на лазерном анализаторе частиц Analysette 22 Nano Tech (фирма Fritsch). Для всех образцов размеры подавляющего числа частиц лежали в диапазоне от 100 нм до 20 мкм (полевой шпат – до 25 мкм).

Определение электрокинетического (ζ -потенциал) потенциала минеральных частиц. Определение ζ -потенциала проводили в электролите (0,9 %-ный раствор NaCl) с использованием прибора Zeta Sizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при температуре 25 °С, фиксированном угле рассеяния 173 °С и длине волны лазера 633 нм.

Углеродные наноматериалы (УНМ)

Рамановская спектроскопия была использована для характеристики образцов УНМ. Рамановские спектры были собраны с помощью дисперсионного комбинационного рассеяния Morphologi G3-ID с диодным лазером 785 нм (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Результирующая мощность лазера на образце составляла 4 мВт в режиме малой мощности.

Многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ)

Характеристики МУНТ приведены в табл. 1. Многослойные углеродные нанотрубки были получены в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (г. Новосибирск) методом химического осаждения из паровой фазы на поверхности катализатора (активный компонент Fe-Co) в трубчатом реакторе при 680 °С (Kuznetsov et al., 2010, 2012). Все МУНТ были нами разделены на две группы – с примесями и без примесей. Они были очищены от примесей двумя способами: химическим и термическим. Чтобы удалить катализатор, нанотрубки кипятили в 15

%-ной HCl и затем промывали в дистиллированной воде до нейтральной реакции. МУНТ обжигались при 2600 °С.

Таблица 1

Многослойные нанотрубки

Тип	Марка	Физ.-хим. характеристика
МУНТ-1	<p>МУНТ-1.1 Диаметр 8–10 нм, удельная поверхность ($S_{\text{ВЕТ}}$ = 400 м²/г); примеси: Fe 0,6 %, Co 0,3 и Al 0,9 %</p> <p>МУНТ-1.2 Диаметр 12–14 нм, примеси: Fe 2,4%, Co 1,3%, Mg 2,5 %</p>	<p>Не очищенные от примесей металлов. Имеют размер от 8 до 20 нм и удельную поверхность от 130 до 400 м²/г</p>
МУНТ-2	<p>МУНТ-2.1 Диаметр 18–20 нм с удельной поверхностью ($S_{\text{ВЕТ}}$) = 130 м²/г</p> <p>МУНТ-2.2 Диаметр 18–20 нм, отожженные при 2600 °С, удельная поверхность 150 м²/г, примеси: Fe 0,0014 %, Ca – 0,0036 %, Si – 0,0098 %</p> <p>МУНТ-2.3 Диаметр 8–10 нм, отожженные при 2600 °С, содержали следовые количества примесей</p> <p>МУНТ-2.4 Диаметр 8–10 нм, площадь удельной поверхности ($S_{\text{ВЕТ}}$) 300 м²/г, тип обработки: кипячение концентрированной HCl в течение 8 ч и основные примеси (мас. %×10²): Fe (16), Co (7), Mg (5) и Cl (1)</p> <p>МУНТ-2.5 Диаметр 12–14 нм, очищенные, примеси: Fe 0,16%; Co 0,07%; Mg 0,05 %</p> <p>МУНТ-2.6 Диаметр 12–14 нм, отмытые</p>	<p>Очищенные от примесей металлов. Имеют размер от 8 до 20 нм и удельную поверхность от 130 до 400 м²/г</p>

МУНТ представляли собой агрегаты размером от 5 до 100 мкм (рис. 2).

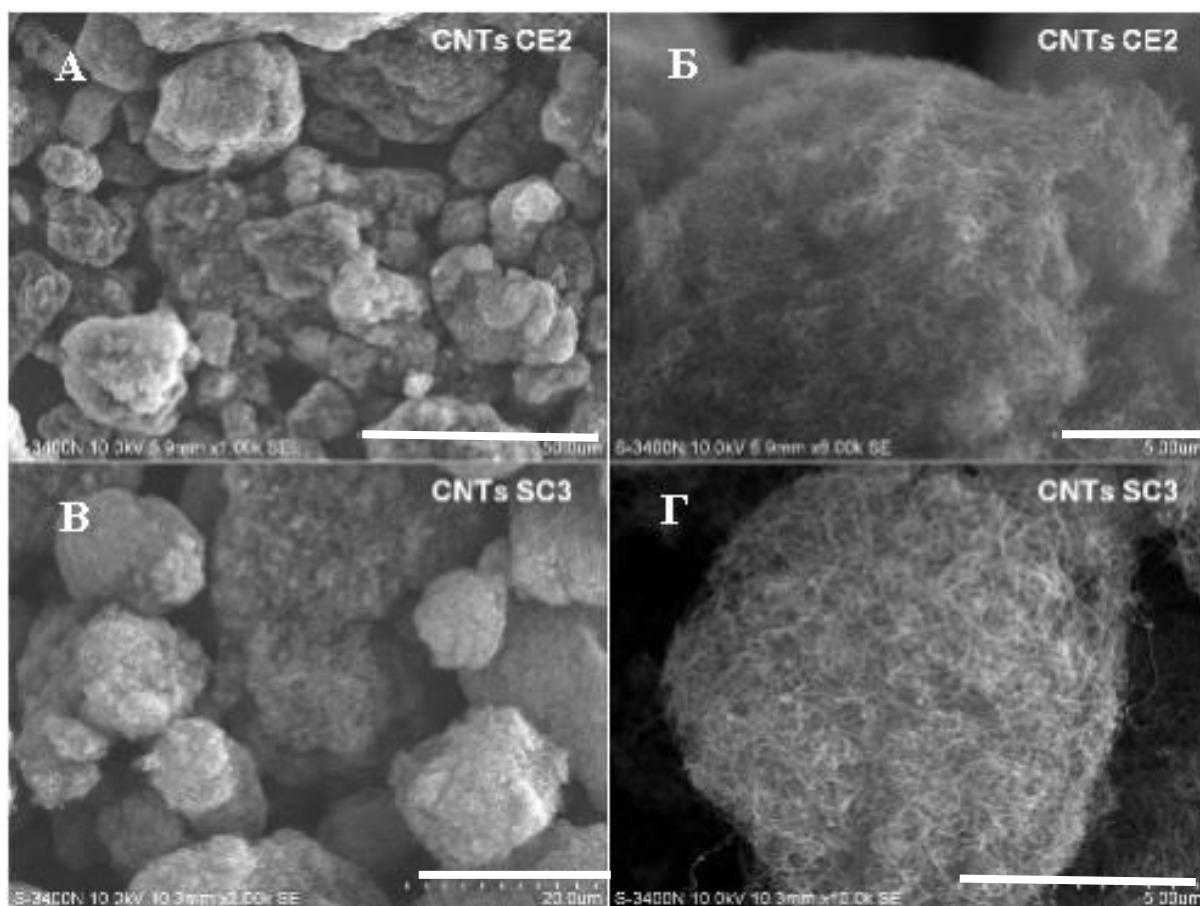


Рис. 2. Микрофотографии МУНТ, полученные методом электронной сканирующей микроскопии. А, Б – МУНТ-2.2; В, Г – МУНТ-2.1. Измерительный отрезок: А – 50 мкм, Б – 5 мкм, В – 20 мкм, Г – 5 мкм

Очистку МУНТ от металлических примесей осуществляли кипячением концентрированной соляной кислоты (HCl) в течение 8 ч.

Размер агрегатов был определен, а их структура была охарактеризована с использованием сканирующего электронного микроскопа S 3400N (Hitachi, Япония), оборудованного дисперсионным спектрометром ультрасухой энергии (Thermo Scientific, США) и лазерным анализатором частиц Fritsch Analysette 22 NanoTec plus (Fritsch, Германия).

Металлические примеси оценивали с помощью рентгенофлуоресцентного анализа (XrFA). Волново-дисперсионный рентгеновский флуоресцентный спектрометр ARL Advant'x 3600 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) и программного обеспечения для анализа данных OXSASV1.5.

Углеродные нановолокна (УНВ)

Характеристики УНВ приведены в табл. 2.

Таблица 2

Углеродные нановолокна

Тип	Марка	Физ.-хим. характеристика
УНВ-1	УНВ-1.1 Температура синтеза 600 °С, примеси: Al ₂ O ₃ – 0,4 %, Ni – след УНВ-1.2 Температура синтеза 800 °С, примеси: Ni – 3,6 %, Al ₂ O ₃ – 0,4 % УНВ-1.3 Температура синтеза 500 °С, C ₃ -C ₄ площадь удельный поверхность 103 м ² /г	Необработанные
УНВ-2	УНВ-2.1 Обработаны HNO ₃ , площадь удельный поверхность 125 м ² /г УНВ-2.2 Обработаны HNO ₃ , площадь удельный поверхность 103 м ² /г	Обработанные

УНВ были синтезированы в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (Новосибирск) путем каталитического разложения смеси пропан-бутан (C₃-C₄) на гетерогенном катализаторе из 90 % NiO+ 10 % Al₂O₃ приготовленный методом совместного осаждения нитратов никеля и алюминия (Golokhvast et al., 2015) (рис. 3).

Углеродные нановолокна УНВ-1.1 и УНВ-1.2 были получены каталитическим разложением соответственно при 600 и 800 °С. УНВ содержали небольшое количество примесей: Al₂O₃ – 0,4 %, Ni – след для УНВ-1.1 и Ni – 3,6 %, Al₂O₃ – 0,4 % для УНВ-1.2. Диаметр УНВ составлял от 20 до 200 нм, в среднем 85 нм, а их длина – от 5 до 50 мкм. Удельные площади поверхности УНВ-2.2 и УНВ-2.1 составляли соответственно 103 и 125 м²/г. Синтез проводился на установке с роторным реактором при температуре 500 °С. Выход углеродного продукта составил 24 г/г. Морфология полученных УНВ соответствовала коаксиально-коническому типу. Полученный образец УНВ-1.3 был разделен на 3 части. Первая часть была взята в исходном

виде. Вторая часть была обработана в концентрированной азотной кислоте (30 мин), что позволило удалить дисперсные частицы никеля из состава углеродного материала – УНВ-2.1. Третья часть исходного материала УНВ-1.3 была подвергнута влажному размолу в керамической мельнице в суспензии с водой в течение 24 ч – УНВ-2.2 (Tokareva et al., 2015).

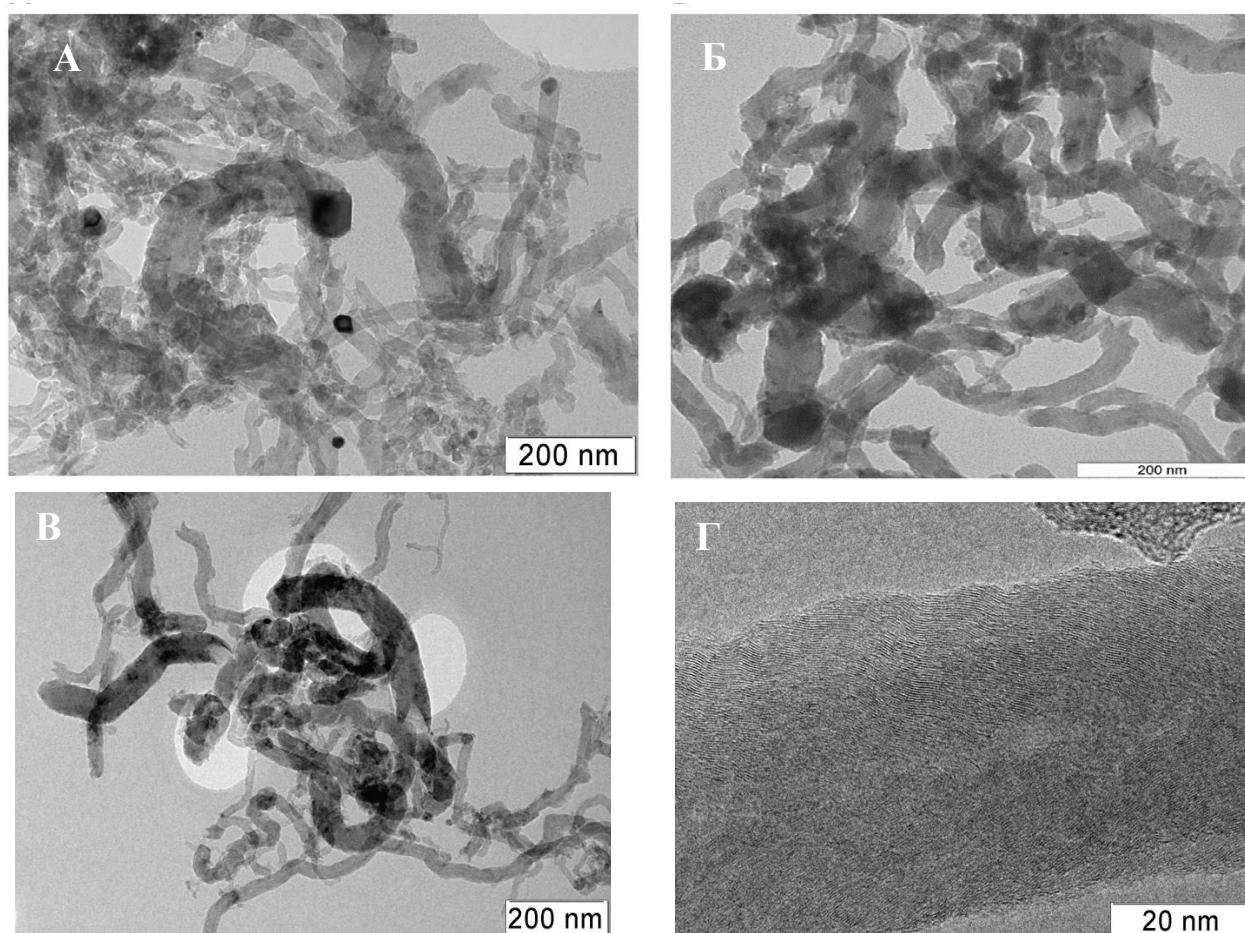


Рис. 3. Микрофотография углеродных нановолокон (УНВ), полученная с использованием электронного микроскопа: А – УНВ-2.2; Б – УНВ-2.1; В, Г – УНВ-1.3 (БР-56)

Кремниевые нанотрубки (КНТ)

Кремниевые нанотрубки КНТ-1 (SNT) и КНТ-2 (INC-2) были любезно предоставлены профессором Паком (химический факультет, Университет Инха, Республика Корея). Площадь удельной поверхности (по результатам BET) $395 \text{ м}^2/\text{г}$, $d \geq 40\text{--}45 \text{ нм}$.

Микроструктура КНТ изучалась с помощью просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии (ПЭМ и СЭМ). Кремниевые нанотрубки имеют гораздо более разветвленную микроструктуру, а отношения длины к диаметру были меньше (рис. 4).

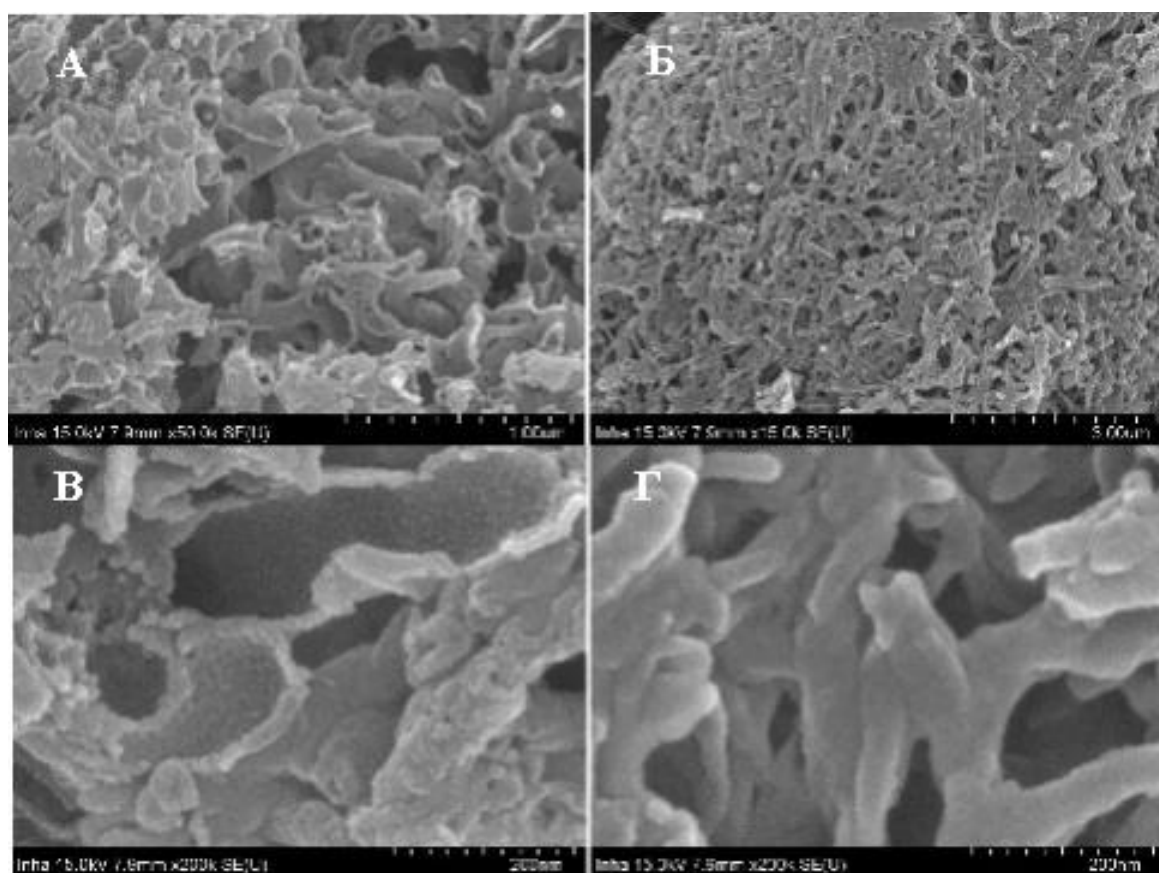


Рис. 4. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) углеродной экстракционной копии кремниевых нанотрубок КНТ: А и В – КНТ-1; Б и Г – КНТ-2. Измерительный интервал: А – 1 мкм, Б – 3 мкм, В – 200 нм, Г – 200 нм

Наночастицы металлов

Золотые наночастицы диаметром 60-80 нм получены методом Туркевича (Turkevich et al., 1955). Наночастицы TiO_2 произведены компанией Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Germany, CAS number 1317-70-0, product number 39953) Характеризацию наночастиц проводили на электронном микроскопе S5500 (Hitachi, Япония) (рис. 5).

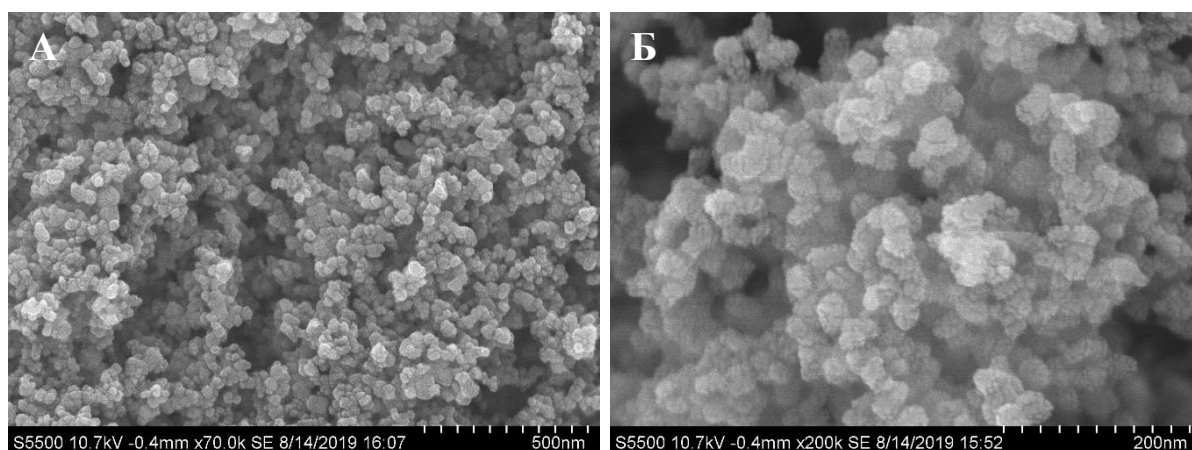


Рис. 5. ПЭМ-изображения наночастиц TiO_2 : А – измерительный отрезок 500 нм, увеличение 70.000; Б – измерительный отрезок 200 нм, увеличение 200.000

Частицы диоксида титана имеют средний размер 32 нм и имеют фазовую структуру анатаза (рис. 6, табл. 3). Квантовые точки – наночастицы сульфидов кадмия и цинка – были получены в Университете горного дела и геологии им. Святого Иоанна Рыльского (София, Болгария) и предоставлены доктором Нели Минтчевой (Mintcheva et al., 2019) (рис. 7 и 8).

Химический и гранулометрический состав наночастиц был исследован с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6010PLLIS/LA (JEOL, Япония) и просвечивающего электронного микроскопа JEM 2100 tools (JEOL, Япония), а средний размер наночастиц составил 6,3 нм (5–9 нм) и 3,9 (2,6–5,6 нм) нм соответственно для CdS и ZnS (табл. 4).

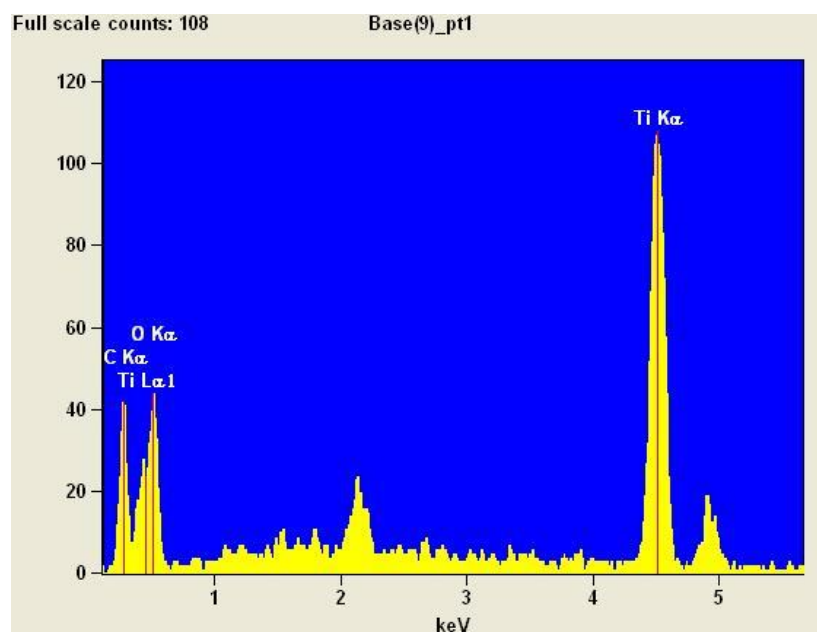


Рис. 6. Энергодисперсионный анализ наночастиц TiO_2 (см. табл. 3)

Таблица 3

Состав наночастиц TiO_2 , полученный с помощью EDX

Элемент	Масс., %	Атом., %	Ошибка среднего, атом., %,
С К	21,04	39,54	$\pm 1,99$
О К	24,75	34,92	$\pm 2,04$
Тi К	54,21	25,54	$\pm 0,66$
Тi L	—	—	—
Итого	100,00	100,00	

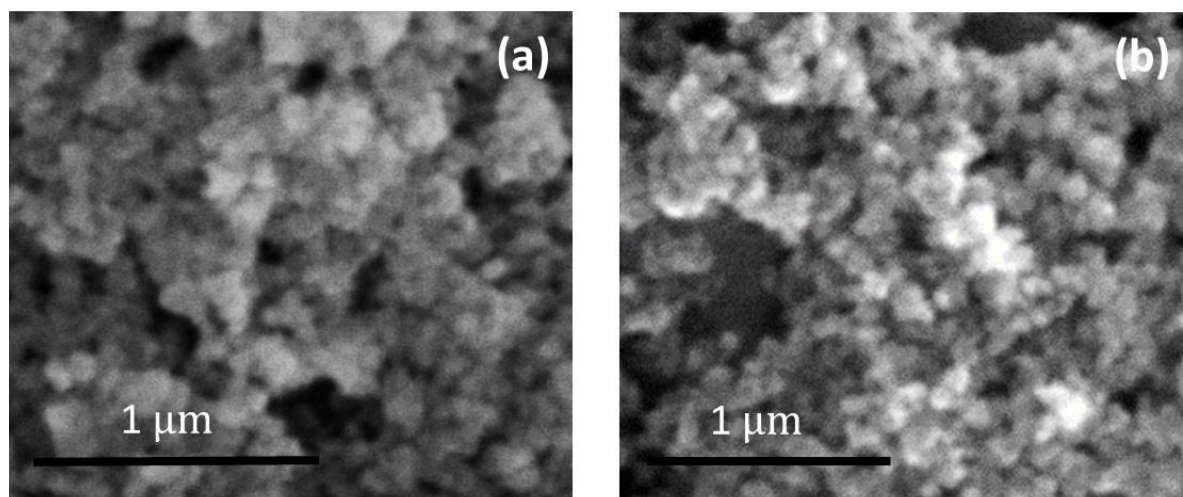


Рис. 7. ПЭМ-изображения наночастиц: **a** – CdS, измерительный отрезок – 1 мкм; **b** – ZnS, измерительный отрезок – 1 мкм

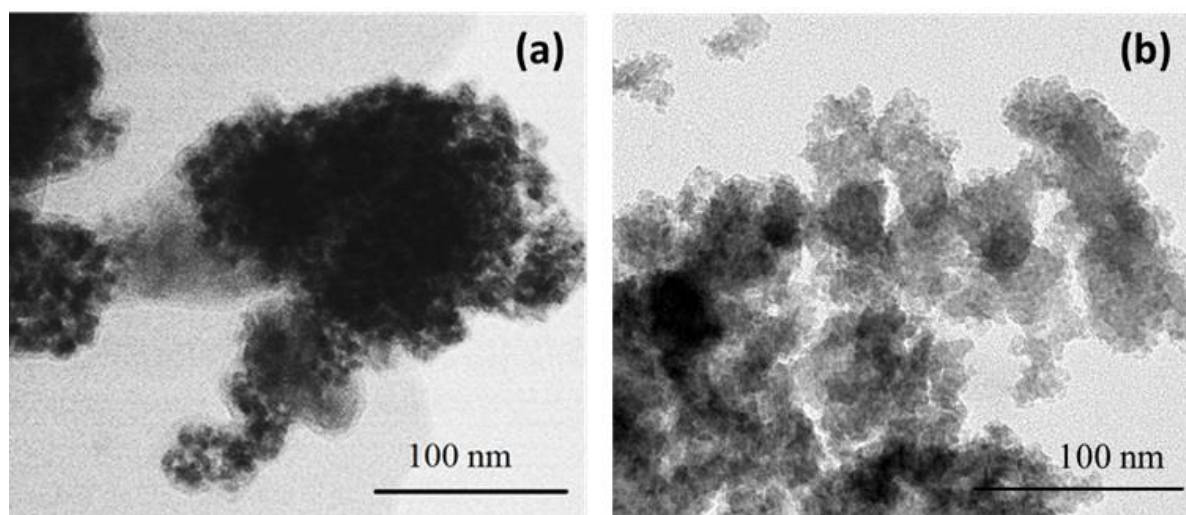


Рис. 8. СЭМ-изображения наночастиц: **a** – CdS, измерительный отрезок – 100 нм; **b** – ZnS измерительный отрезок – 100 нм

Таблица 4

Состав наночастиц CdS и ZnS, полученный с помощью EDX

Показатель	CdS		ZnS	
	Cd	S	Zn	S
Масс. %	76,74	23,26	79,32	20,67
Атом. %	48,48	51,52	65,32	34,68

Фазовый состав был исследован с помощью рентген-дифракционного анализа с помощью BRUKER D2 Phaser instrument (Cu/Ni radiation, $\lambda = 0,154184$ nm) (рис. 9).

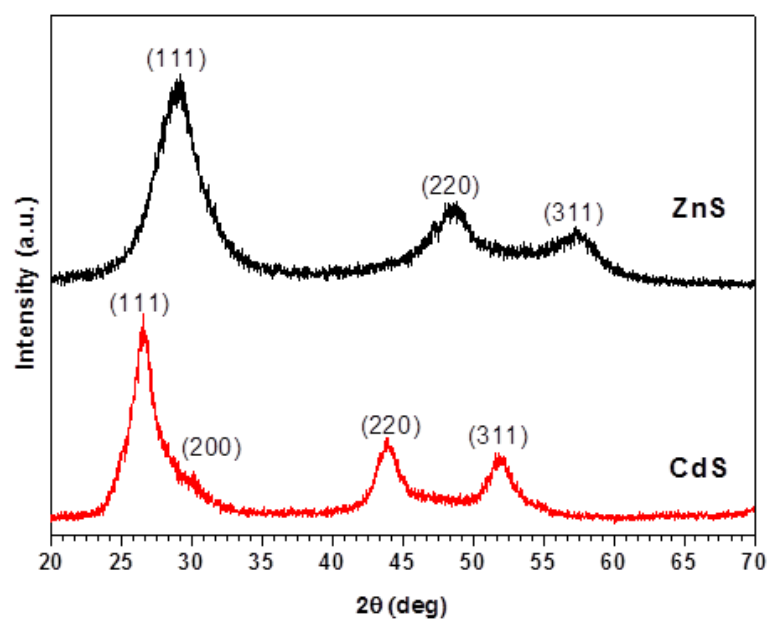


Рис. 9. Рентгенодифракционный анализ наночастиц CdS и ZnS

Наночастицы CdS и ZnS содержат кубическую кристаллическую фазу (см. рис. 7, a, b).

Моделирование поведения синтетических наноматериалов в водной среде

В данном разделе исследовалось поведение синтетических наноматериалов (МУНТ, УНВ, КНТ, Au, TiO, CdS, ZnS) в деионизированной (идеальной модельной) воде. Деионизированная вода была произведена на SGWASSER Ultra Clear TWF/EL-ION UV plus TM (Siemens, Берлин, Германия). Кинетические исследования методом спектрофотометрии проводились с использованием двухканального спектрометра UV 2550 (Shimadzu, Tokio, Japan). Максимальное поглощение света исследуемых образцов наблюдалось при длине волны 195 нм.

Суспензии синтетических наночастиц готовили в концентрации 100 мг/л. Ультразвуковое диспергирование раствора, как аналога естественного перемешивания, проводили ультразвуковым диспергатором Sonopulse HD (Bandelin, Рим, Италия) 3100 в течение 3 мин (энергия 6384 ± 120 кДж). После ультразвукового диспергирования воду с синтетическими материалами выливали в лоток объемом 4 мл и помещали в спектрофотометр. Поглощение света регистрировали в течение недели с интервалом в 1 мин (всего 10080 измерений).

Статистический анализ был выполнен в STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., США). Различия между контрольной и экспериментальной группами анализировали с использованием одностороннего ANOVA. $P \leq 0,05$ считалось статистически значимым. Все экспериментальные данные были представлены как среднее \pm стандартное отклонение. ($P < 0,05$).

2.2. Методы проведения экспериментальных исследований с живыми организмами

Исследование влияния наноматериалов на микроводоросли

Культуры микроводорослей были предоставлены Национальным научным центром морской биологии (ННЦМБ) ДВО РАН. Биоиспытания токсичности наночастиц были проведены на 6 видах морских микроводорослей, изолированных в зал. Петра Великого (Японское море, Приморский край) (рис. 10):

- диатомовые водоросли *Attheya ussuriensis* (Stonik et al., 2006) (рис. 10, а), *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1896) (рис. 10, в), *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex P. T. Cleve) Hasle (клон PP-07);
- динофлагелляты *Heterosigma akashiwo* (Hara, Chihara, 1987) (рис. 10, б);
- золотистая водоросль *Isochrysis galbana* Parke (клон TISO) (Parke, 1949) (рис. 10, д);
- красная водоросль *Porphyridium purpureum* (Drew, Ross, 1965) (рис. 10, г).

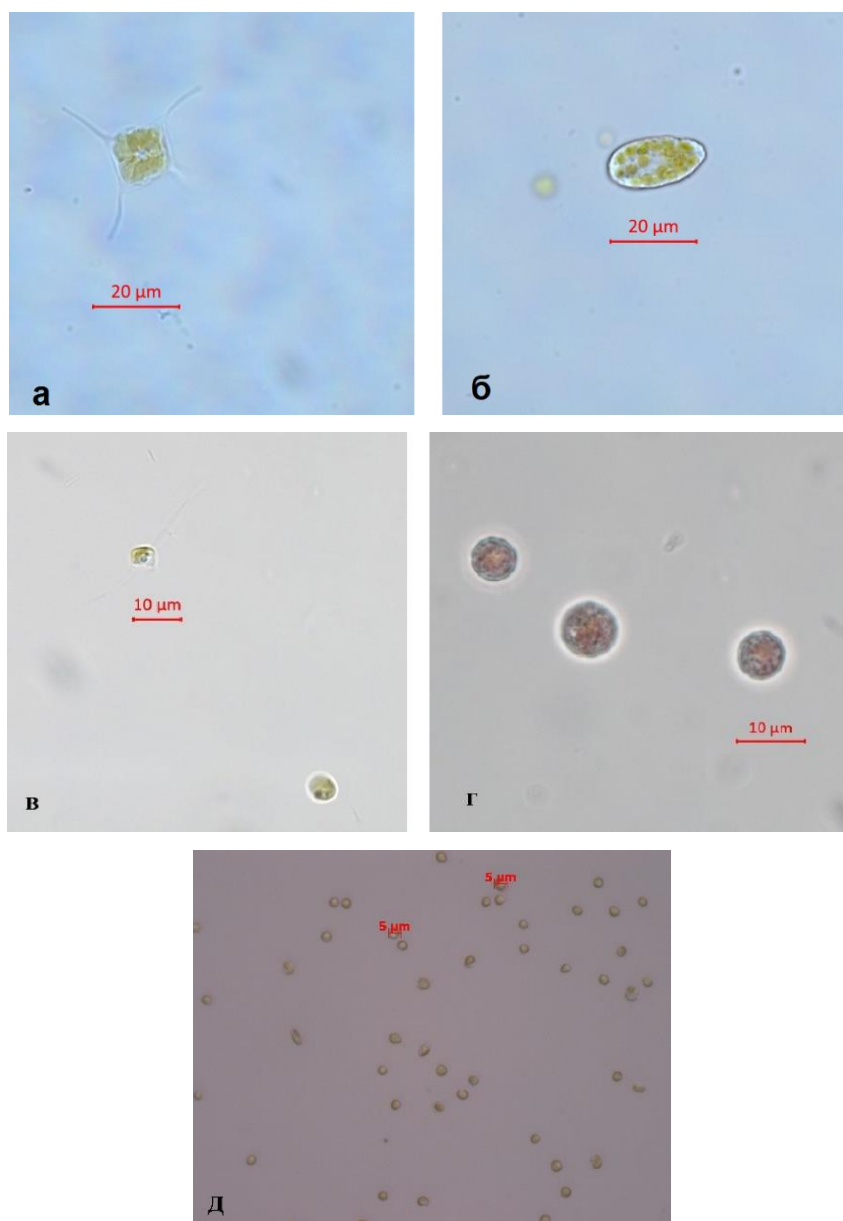


Рис. 10. Микроводоросли: а – *A. ussuriensis*; б – *H. akashiwo*; в – *C. muelleri*; г – *P. purpureum*, д – *I. galbana*

Для культивирования морских микроводорослей и в качестве контроля в биотестированиях применялась среда f/2 (Guillard, Ryther, 1962; Орлова и др., 2010), приготовленная с использованием фильтрованной и стерилизованной морской воды

соленостью 32 ‰. К 1 л морской воды добавляли 75 мг NaNO_3 , 5 мг $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 мг $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 100 мг тиамин (B₁), 0,5 мг биотин (B₇), 0,5 мг витамина B₁₂, 1 мл раствора микроэлементов. Культивирование проводилось в колбах Эрленмейера (250 мл). Для испытаний отбирались культуры водорослей в экспоненциальной фазе роста с плотностью $(1-5) \cdot 10^3$ клеток/мл (кл./мл). Среда имела температуру 20 ± 2 °C, pH $8,0 \pm 0,2$, интенсивность освещения 300 мкмоль фотонов/м²·с, цикл освещения 12 : 12 ч.

Концентрацию клеток в культуре определяли под микроскопом в счетной камере «Седвик-Рафтера» (Sedgewick Rafter Countingcells) объемом 1 мл. Микрофотографии микроводорослей были получены с помощью конфокальной микроскопии LSM 800 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением x200 и x600. Анализ клеток водорослей и подсчет клеток, окрашенных йодидом пропидия, проводили с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) со светом возбуждения 405 нм, 488 и 638 нм (Suman et al., 2015). Аликвотные объемы для анализа составляли 0,1 мл на образец.

Все эксперименты по определению токсичности НМ с использованием моделей микроводорослей были проведены в соответствии с руководством ОЭСР № 201 (OECD, 2006) с незначительными изменениями. Метод основан на определении разницы в интенсивности роста водорослей в контрольной среде и тестовом образце. Критерием токсического эффекта является статистически значимое уменьшение количества клеток водорослей в образцах по сравнению с контролем для 72-часового биоанализа (условно «острая токсичность») и в течение 7 дней («хроническая токсичность»). Тесты на токсичность проводили в 24-луночных планшетах для культивирования клеток. Каждое вещество, среду и инокулят водорослей смешивали до получения начальной концентрации водорослей 10000 кл./мл в 2,0 мл объема биоанализа. Все наноматериалы были взяты в концентрациях: 1 мг/мл; 10; 100; 250; 500 и 1000 мг/мл. Использовали по меньшей мере четыре повторения на концентрацию.

Для оценки уровня влияния на гидробионты и определения механизмов токсичности исследуемых образцов использовались специфические флуоресцентные

красители (биомаркеры), интенсивность свечения которых измерялась с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX. Также были использованы данные средней интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* для определения изменений интенсивности фотосинтеза и данные прямого светорассеяния для определения изменений размера клеток микроводорослей при воздействии исследуемых компонентов. Во всех случаях, в качестве источника возбуждающего света был использован синий лазер (488 нм), так как свет данной длины волны соответствует максимуму абсорбции используемых биомаркеров, их метаболитов и хлорофилла *a*. Для регистрации показателей флуоресценции каждого биомаркера были использованы фильтры эмиссии, подобранные в соответствии с максимумом эмиссии, заявленным производителем биомаркеров (Molecular Probes, США) или приведенным в литературе. Показатели, оцениваемые в процессе биоиспытаний, и условия их регистрации показаны в табл. 5.

Таблица 5

Критерии оценки влияния исследуемых веществ на морские микроводоросли и условия их регистрации

Критерий	Время измерения	Биомаркер	Фильтр эмиссии, нм
Выживаемость	24 ч, 96 ч, 7 сут	Йодид пропидия, PI	ECD (оранжевый), 610
Размер	96 ч, 7 сут	Прямое светорассеяние	FSC (прямое светорассеяние синего лазера)
Интенсивность флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	96 ч, 7 сут	Автофлуоресценция	PC5.5 (красный), 690
Ферментативная (эстеразная) активность	3 ч, 24 ч	Флуоресцеин диацетат, FDA	FITC (зеленый), 525
Мембранный потенциал	6 ч, 24 ч	3,3-дигексилосакарбоцианин иодид, DIOS₆	FITC (зеленый), 525

Для оценки выживаемости, эстеразной активности и мембранного потенциала каждого вида микроводорослей была проведена серия предварительных измерений с целью установить оптимальную концентрацию флуоресцентных красителей и время экспозиции клеток с красителем. Для определения фазы роста и отбора культур микроводорослей в экспоненциальной фазе, предварительно были постро-

ены кривые роста для каждого вида. Чувствительности микроводорослей и их пригодность для использования в качестве тест-организмов была оценена в эксперименте с эталонным токсикантом бихроматом калия ($K_2Cr_2O_7$).

Изменение фотосинтезирующей способности микроводорослей является чувствительным индикатором внешних воздействий, а измерение флуоресценции хлорофилла *a* – эффективный и быстрый способ, позволяющий выявить вещества и условия, оказывающие влияние на фотосинтез микроводорослей (Marwood et al., 2001). Для определения размера клеток микроводорослей, для канала прямого светорассеяния FSC был использован набор калибровочных частиц (партия F13838, Molecular probes, США) с размерами 1, 2, 4, 6, 10, 15 мкм.

Микроскопическая водоросль *H. akashiwo* (класс Raphidophyceae) использовалась в качестве тестируемого штамма. Среду готовили с использованием фильтрованной и стерилизованной морской воды с соленостью 32 ‰ с последующим добавлением стерильного раствора среды F (Guillard, Ryther, 1962). Millipore фильтры 0,22 мкм были использованы для фильтрации 1 л морской воды, куда также добавляли следующие компоненты: 75 мг $NaNO_3$, 5 мг $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 30 мг $NaSiO_3 \cdot 9H_2O$; 100 мг тиамин- HCl , 0,5 мг биотина и 0,5 мг витамина B12, исходный раствор микроэлементов 1 мл. Культуры инкубировали при 20 ± 2 °C со светом, полученным от люминесцентных ламп и циклом свет-темнота 12 : 12 ч; колбы встряхивали один раз в день. Все камеры освещались сверху и были равноудалены от источников света. Метод проточной цитометрии с окрашиванием йодидом пропидия использовали для подсчета количества клеток водорослей (Suman et al., 2015).

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения STATISTICA 10 (Stat Soft, Inc., США). Для анализа использовался односторонний тест ANOVA, значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Механизм действия PI заключается во включении пар оснований ДНК или РНК, после чего краситель увеличивает интенсивность флуоресценции в 20–30 раз (Suzuki et al., 1997). Поскольку PI не способен проникать через неповрежденные мембраны живых клеток, следовательно, клетки, интенсивность флуоресценции которых в эмиссионном фильтре ECD (610 нм) резко увеличилась по сравнению с

контролем, можно определить как мертвые. Клетки водорослей окрашивали PI в течение 10 мин в концентрации 20 мкмоль. Подсчет живых клеток микроводорослей проводили путем идентификации клеток, имеющих хлорофилл, автофлуоресценции и исключения мертвых клеток из подсчета. Количество клеток рассчитывали в процентах от контрольной группы.

Морфологические изменения клеток микроводорослей наблюдали при оптическом Микроскоп Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия). Статистический анализ проводили в программном комплексе STATISTICA 10 (Stat Soft, Inc., США). Для анализа использовался односторонний тест ANOVA. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Исследование влияния наноматериалов на животных Иглокожие

Морских ежей *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) собирали в бухте Средней, зал. Восток на глубине 4,0–4,5 м. Для приготовления тестируемых растворов и в контрольном опыте для выращивания личинок морского ежа использовали морскую воду из зал. Восток (район биостанции «Восток» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН), которую отбирали с глубины 6 м через систему аквариальной. Воду фильтровали через трехфракционный гравийный фильтр и стерилизовали ультрафиолетом. Температуру во время опытов поддерживали на уровне 17,0–17,5 °С. Соленость воды составляла 33,7 ‰, pH – 8,18.

Нерест взятых в опыт животных стимулировали введением в перивисцеральную полость 0,2 мл 0,5 М раствора хлорида калия. Яйцеклетки получали и подготавливали к эксперименту по стандартной методике (Бузников, Подмарев, 1975). Сперму собирали “сухим” методом непосредственно перед экспериментом, разбавляя чистой морской водой. В стеклянный сосуд с тестируемыми растворами (или стерильной морской водой в контрольном эксперименте) помещали яйцеклетки так, чтобы они располагались на дне монослоем. Затем сюда же добавляли 1 мл разбавленной в 20 000 раз спермы (конечное разведение составляло 40 000–60 000

раз), осуществляя оплодотворение. Качество половых клеток предварительно проверяли с помощью оплодотворения и последующего определения процента нормальных зигот. Яйцеклетки с уровнем оплодотворения ниже 95 % не использовали.

Для приготовления тестируемых растворов использовали препараты МУНТ с размером частиц 8–10 нм (МУНТ-1.1) и 18–20 нм (МУНТ-2.1). Вначале готовили маточный раствор путем разведения навески 1 г в 1 л дистиллированной воды, далее тестируемые растворы готовили путем разбавления маточного раствора стерильной морской водой.

В остром эксперименте экспозиции в тестируемых растворах, содержащих частицы 8–10 нм (МУНТ-1.1) (1 ч), подвергали как яйцеклетки, так и сперматозоиды. Далее развитие эмбрионов и личинок продолжалось в присутствии тестируемого вещества в сосуде. Предварительно тестируемые растворы подвергали воздействию ультразвука с помощью ультразвуковой бани «Серьга» (Россия) в течение 5 мин. В хроническом эксперименте выдерживали по 10 половозрелых особей в растворах тестируемых веществ в течение 5 сут, ежедневно меняя воду. Использовали пятилитровые кристаллизаторы, снабженные системой подачи воздуха. Наночастицы разводили в профильтрованной, простерилизованной морской воде, перед каждой сменой воды подвергая их воздействию ультразвука.

По окончании экспозиции из каждого экспериментального и контрольного сосуда были отобраны по три родительских пары, от них получены гаметы и проведено оплодотворение. Подсчет нормальных и аномальных эмбрионов и личинок проводили на основных индикаторных стадиях: образование оболочки оплодотворения (30 с), средняя бластула (8 ч), гастрюла (16 ч), ранний плутеус I стадии (26 ч), средний плутеус I стадии (48 ч). Опыты проводили, используя гаметы от двух родительских пар, просчитывая четырежды по 100 эмбрионов и личинок из каждого экспериментального сосуда. Для подсчета и фотографирования фиксировали часть зигот, эмбрионов и личинок 0,02 %-ным раствором глутаральдегида.

Во втором эксперименте изучалось влияние на личинки морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* следующих материалов: МУНТ 2 вида – МУНТ-2.2, МУНТ-2.3; УНВ 2 вида – УНВ-1.1, УНВ-1.2; КНЧ 2 вида – КНЧ-1, КНЧ-2; TiO₂; Au;

CdS; ZnS. Взрослые особи морского ежа *S. intermedius* (Agassiz, 1864) были собраны в бухте Новый Джигит зал. Петра Великого Японского моря. Мужские и женские гаметы получали и затем оплодотворяли в соответствии с модифицированной методикой Бузникова (1975). Все эксперименты проводили в 24 луночных планшетах в климатокамере при температуре 15 °С. Всего было проведено три типа биоиспытаний. Отдельно проводили исследование влияния наночастиц на оплодотворяющую способность спермиев, оплодотворяемость яйцеклеток и исследование влияния наночастиц на развитие эмбрионов морского ежа.

Для определения оплодотворяющей способности спермиев к 1 мл суспензии спермиев $1 \cdot 10^7$ кл./мл в стерильной морской воде добавляли 100 мкл раствора испытуемых наночастиц в концентрациях 1, 10, 100, 250, 500 и 1000 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин. Затем наблюдали подвижность спермиев под микроскопом и добавляли по 100 мкл неоплодотворенных яйцеклеток $2 \cdot 10^4$ кл./мл. Для каждого вещества и концентрации проводили по три параллельных эксперимента, а затем оценивали ингибирование оплодотворения.

Для определения оплодотворяемости яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* к 900 мкл суспензии зрелых яйцеклеток $2 \cdot 10^3$ кл./мл в стерильной морской воде добавляли 100 мкл раствора испытуемых наночастиц для получения итоговых концентраций 0,1, 1,0, 10,0, 25,0, 50,0 и 100,0 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин. Затем наблюдали целостность яйцеклеток под микроскопом и добавляли по 100 мкл спермиев $1 \cdot 10^8$ кл./мл. Каждый эксперимент повторяли трижды, а затем оценивали ингибирование оплодотворения.

Затем оценивали влияние веществ в тех же концентрациях на жизнеспособность и развитие (отличия в стадиях деления, аномалии и гибель) эмбрионов морского ежа *S. intermedius* (рис. 11). Для этого сначала проводили оплодотворение яйцеклеток 1 мл $2 \cdot 10^3$ кл./мл, добавляя 100 мкл спермиев $1 \cdot 10^8$ кл./мл. Затем через 5 мин добавляли 100 мкл раствора испытуемых наночастиц для получения итоговых концентраций 0,1, 1,0, 10,0, 25,0, 50,0 и 100,0 мкг/мл. За жизнеспособностью и развитием эмбрионов наблюдали в течение 48 ч. Для оценки эмбриотоксичности

наночастиц подсчитывали количество погибших, замерших и не симметрично делящихся клеток на каждые 100 кл. Подсчет производили через 2, 4, 6, 24 и 48 ч от начала эксперимента.

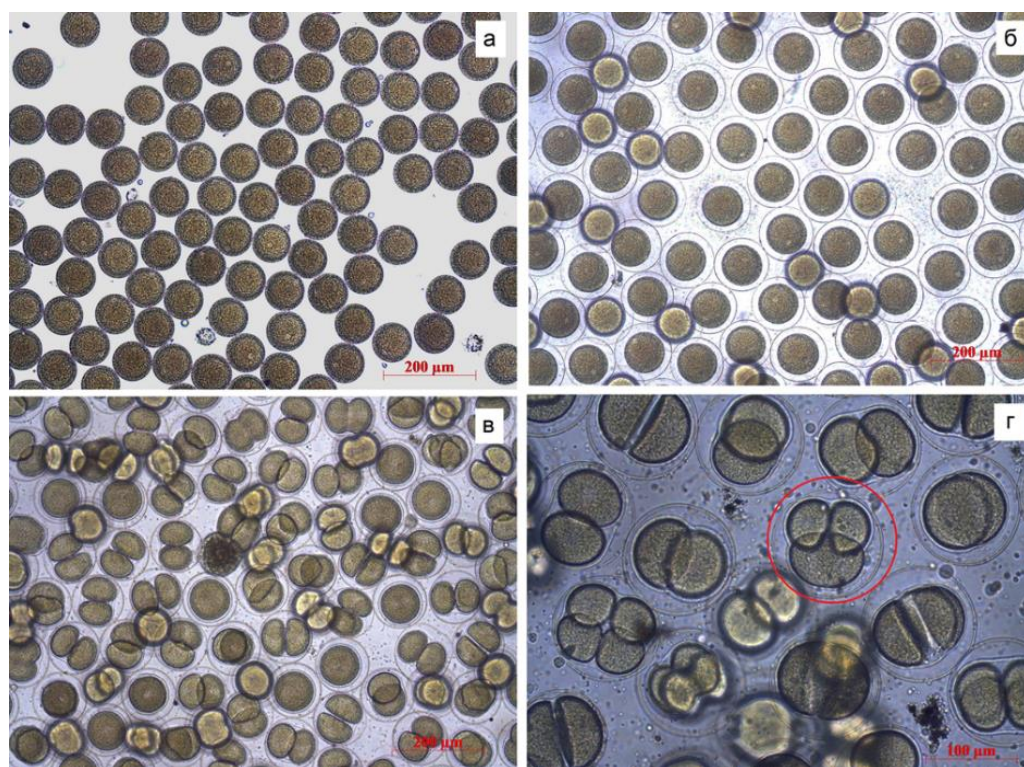


Рис. 11. Стадии развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius*: а – неоплодотворенные яйцеклетки; б – оплодотворенные яйцеклетки; в – нормальная форма развития эмбриона; г – пример несимметричного деления яйцеклетки

Морфологические изменения изучали с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Observer A1 (Zeiss, Германия) и Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), для фотосъемки использовали Axio Cam 3 (Zeiss, Германия) и программу компьютерной морфометрии Axio Vision 4.2. Все измерения делались на увеличении $\times 200$ и $\times 600$. Для вывода результатов использовалось специализированное программное обеспечение ZEN 2 (Carl Zeiss, Германия).

Все эксперименты проводили одновременно и в одинаковых условиях, минимум в трех параллелях. Достоверность результатов оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) в программе GraphPadPrism8.0.2 (GraphPadSoftware, США). Результаты рассматривались как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$.

Два вида морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus* были выбраны для изучения биотрансформации углеродных нановолокон УНВ-1.2. Ежи были собраны в сентябре в зал. Петра Великого (Японское море) и помещены на 7 дней в отдельные аэрированные резервуары, куда были добавлены УНТ в концентрации 100 мг/л. Затем конгломераты УНВ забирали из аквариумов и исследовали с помощью дисперсионного рамановского микроскопа Morphologi G3-ID, оборудованного диодным лазером 785 нм (Malvern Instruments Ltd, UK).

Насекомые и высшие ракообразные

Для эксперимента были выбраны и собраны особи трех видов беспозвоночных типа членистоногих (Phylum Arthropoda) из отряда амфипод (семейство Gammaridae: *Gammarus suifunensis*, Martynov, 1925) и личинки насекомых (subphylum Hexapoda, класс Insecta) из отряда *Ephemeroptera* (семейство *Ephemerellidae*: *Drunella cryptomeria*, Imanishi, 1937) и *Diptera* (семейство *Ephemerellidae*: *Drunella cryptomeria*, Imanishi, 1937).

Все виды беспозвоночных принадлежат к функционально-трофической группе «собираателей-собираателей», которые собирают мелкое конкретное органическое вещество (ППОМ) со дна потока. Что касается степени чувствительности к загрязнению, все виды рассматриваются как высокочувствительные индикаторные организмы с соответствующими значениями толерантности, *Ephemerellidae* – 2, *Gammaridae* – 4, *Diamesinae* – 2 (Lenat, 1994). Беспозвоночные были идентифицированы специалистами-таксономистами из лаборатория пресноводной гидробиологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Образцы зообентоса были собраны в р. Черной в г. Владивосток (координаты 43.216442, 132.043871) 16 января 2017 г. с использованием глубокой сетки и метода «кик-проб». Отобранные образцы были перенесены в бассейн, а остатки почвы были смыты той же водой из р. Черной. Температура воды во время процедуры отбора проб составляла 3,5 °С. Образцы помещали живыми в стеклянные контейнеры и затем переносили в лабораторию. Организмы бентоса сортировали и идентифицировали, и хранили в чашках Петри, помещенных в холодильники в тот же

день. После этого отобранные организмы были переведены в экспериментальную лабораторию.

Все членистоногие были разделены на две группы – «Контроль» и «Эксперимент», состоящие из 10 особей каждого вида (каждый вид инкубировали отдельно, во флаконах по 100 мл для клеточной культуры, с доступом воздуха), до эксперимента был акклиматизационный период 72 ч. Контрольная и экспериментальная группы инкубировались в пресной воде, взятой из среды их происхождения (р. Черная, Приморский край), ранее не подвергавшейся воздействию углеродных нановолокон, при постоянной температуре +4 °С в фармацевтическом холодильнике (модель HF.2) без света в течение 7 дней. УНВ-1.2 (100 мг/л) добавляли в группу Эксперимент. До этого, нановолокна диаметром около 90 нм обрабатывали в ультразвуковом гомогенизаторе (Bandelin, Sonopulse 3100, Sonorex Technik) с энергоемкостью 100 Вт в течение 10 мин.

Насекомых для гистологического исследования брали целиком, делали продольные разрезы. Гистологические препараты изготавливали путем пропускания материала через спирты возрастающей концентрации с последующим заливанием в парафиновые блоки. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и готовили из тканей насекомых. Образцы насекомых получали с помощью оптического микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением x200 и x600. Для вывода результатов использовалось специализированное программное обеспечение ZEN 2 (Carl Zeiss, Германия). Некоторые срезы кишечника фиксировали, но не окрашивали для получения спектров комбинационного рассеяния содержимого кишечника насекомых. В другом аналогичном эксперименте с использованием такого же протокола исследований изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) следующих материалов: МУНТ 2 вида – МУНТ-2.2, МУНТ-2.3; УНВ-1.1; КНЧ 2 вида – КНТ-1 и КНТ-2; TiO₂; Au; CdS; ZnS. Концентрация: 100 мг/мл.

Моллюски

Сбор биологического материала и инкубация с наночастицами. Взрослые моллюски *Modiolus modiolus* (Bernard, 1983) (*M. kurilensis*) были собраны в июле

(температура воды 20 °С) в чистой зоне (бухта Витязь, зал. Петра Великого, Японское море) и помещены в аэрированные резервуары с 50 л морской воды из окружающей среды. После 3-дневной акклиматизации моллюски были разделены на четыре группы по десять животных в каждой: две контрольные (1С и 2С) и две экспериментальные (1Е и 2Е). Свежеприготовленные суспензии МУНТ были добавлены в аквариумы с экспериментальными животными при 100 мг/л морской воды. В группе 1Е моллюсков содержали в присутствии МУНТ-2.4 в течение 24 ч, а в группе 2Е – 48 ч. Животные контрольных групп (1С и 2С) с начала эксперимента содержались в стандартных условиях соответственно в течение 24 и 48 ч. После инкубации моллюски контрольной и экспериментальной групп удаляли из эксперимента одновременно с интервалами 30 мин между индивидуумами в каждой группе.

Гистологический анализ органов. Для гистологического исследования моллюсков рассекали жабры, кишечник и пищеварительную железу. Органы фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном растворе формалина (Элемент, Россия), обезвоженном в этанол возрастающих концентраций, встраиваемый в гистомикс экстрапарафин (Био Витрум, Россия). Из этих блоков готовили полутонкие срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световым микроскопом Axio bserver A1 (Zeiss). Камера Axio Cam 3 (Zeiss) использовалась для съемки; для обработки изображений использовалась программа компьютерной морфометрии Axio Vision

Гистопатологические изменения в органах были зафиксированы визуально. Степень вакуолизации клеток в эпителии выражали в виде процента вакуолизированных эпителиоцитов в клеточной популяции. Морфометрический анализ включал измерение длины, ширины и площади клеток и их ядер. Статистический анализ включал определение средних значений исследуемых параметров и их стандартных ошибок и достоверности различий на уровне значимости $p < 0,05$ с использованием критерия Стьюдента.

Исследование популяции гемолимфы с помощью проточной цитометрии.

Для анализа методом проточной цитометрии образцы гемолимфы отбирали из заднего аддуктора в 0,3 М раствор натриевой соли EDTA для предотвращения агрегации гемоцитов и фиксировали в виде клеточной суспензии с 4 %-ным параформальдегидом в течение 1 ч. Клеточные суспензии промывали фиксирующим раствором с помощью фосфатно-солевого раствора (PBS), помещали в 1 %-ный раствор агента проницаемости Triton X-100 и окрашивали йодидом пропидия (50 мкг на 1 млн клеток) в присутствии РНКазы А (100 мкг на 1 млн клеток) для количественного определения ДНК в ядрах гемоцитов. Затем образцы анализировали с использованием проточного цитофлуориметра BD Accuri C6 в каналах FSC (прямое светорассеяние), SSC (боковое светорассеяние) и FL2 (флуоресценция йодида пропидия). Отдельные клетки дифференцировали от клеточных агрегатов и остатков на двухпараметрической гистограмме распределения всех событий по площади и высоте флуоресцентного сигнала йодида пропидия (FL2-A против FL2-H). Морфотипы гемоцитов были идентифицированы на двухпараметрической гистограмме распределения отдельных клеток путем прямого и бокового рассеяния света (FSC против SSC). Подсчитывали показатель (%) различных клеточных морфотипов и измеряли средние значения FSC и SSC для гранулоцитов.

В другом эксперименте объектами исследования были взрослые моллюски *Crenomytilus grayanus* (длина раковины ~ 120–160 мм) и *Swiftopecten swifti* (длина раковины ~ 80–100 мм) были собраны в сентябре в зал. Петра Великого (Японское море) и помещены в аэрированные резервуары с морской водой. Моллюски обоих видов были разделены на 2 группы: контрольная и экспериментальная, по 15 особей в каждой. Свежеприготовленные суспензии МУНТ-2.4 добавляли в экспериментальные резервуары при 100 мг/л морской воды. Экспериментальные моллюски подвергались воздействию наночастиц до 48 ч, при этом контрольные моллюски содержались в течение того же времени в стандартных условиях. После инкубации контрольный и экспонированный моллюски были удалены из эксперимента одновременно.

Для гистологического анализа кусочки органов (жабры, кишки и пищеварительная железа) иссекали через 24 и 48 ч воздействия, фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном растворе формалина (Элемент, Россия), обезвоживали в этаноле и встраивали в гистомикс парафин экстра (Био Витрум, Россия). Готовили полутонкие срезы, окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световым микроскопом Axio Observer A1 (Zeiss, Германия). Идентификацию МУНТ на предметных стеклах проводили с использованием светового микроскопа Morphologi G3SE-ID (Malvern, England) путем сравнения спектров RAMAN темных выводов в органах со стандартными спектрами исследованных МУНТ (длина волны 785 нм).

Через 48 ч образцы гемолимфы были взяты из заднего аддуктора в 0,3 М раствор соли натрия ЭДТА. Образцы фиксировали 4 %-ным параформальдегидом в виде клеточной суспензии. Для каждого индивидуума одну часть суспензии использовали для расчета концентрации гемоцитов в камере Горяева, а другую часть анализировали с помощью проточной цитометрии.

При цитометрическом анализе клеточные суспензии дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Затем полученные клеточные осадки ресуспендировали в 1 %-ный раствор TritonX-100 и окрашенный пропидия йодидом (50 мкг на 10^6 кл.) в присутствии РНКазы А (100 мкг на 10^6 кл.). С использованием проточного цитометра BD Accuri C6 (США) содержание ДНК составляло измеряется для идентификации отдельных клеток в образцах гемолимфы (Anisimova et al., 2015). Параметры прямого и бокового рассеяния света (FSC и SSC) оценивались для отдельных ячеек как показатели соответственно их размера и зернистости.

Для биохимического анализа образцы пищеварительной железы и гемолимфы были взяты через 48 ч, немедленно заморожены в жидком азоте и выдерживались при -70 °С перед анализом. Деятельность глутатион-S-трансфераза и каталаза, концентрация восстановленного глутатиона и степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) были проанализированы как молекулярные биомаркеры окисли-

тельного стресса. Образцы пищеварительной железы 1 г гомогенизировали с использованием 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 7,5) на ледяной бане. Гомогенаты центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. Супернатанты использовали для измерения концентрации белка по методу Гринберга. Концентрацию восстановленного глутатиона измеряли с использованием реагента Элмана, интенсивность ЛП анализировали по количеству малонового диальдегида, который был обнаружен с помощью анализа 2-тиабарбитуровой кислоты. Активность глутатион-S-трансферазы определяли с использованием 1-хлор-2,4-динитробензола в качестве субстрата, а активность каталазы определяли с использованием перекиси водорода, как описано ранее (Danilenko, Lukyanova, 2014). Все измерения были выполнены с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-3100S (Япония). Статистический анализ включал определение средних значений исследуемых параметров и их стандартных ошибок и достоверности различий на уровне значимости $p < 0,05$ с использованием критерия Стьюдента.

В эксперименте по изучению биотрансформации углеродных нановолокон УНВ-1.2 объектами исследования были взрослые моллюски *Crenomytilus grayanus* (длина раковины ~ 120–150 мм), которые были собраны в сентябре в зал. Петра Великого (Японское море) и помещены на 7 дней в отдельные азрированные резервуары с морской водой, куда были добавлены УНТ в концентрации 100 мг/л. Затем конгломераты УНВ забирались из аквариумов и исследовались с помощью дисперсионного рамановского микроскопа Morphologi G3-ID, оборудованного диодным лазером 785 нм (Malvern Instruments Ltd, UK).

Объектами исследования также была гемолимфа взрослых моллюсков *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) (длина раковины ~ 120–160 мм), Мидия *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (длина раковины ~ 120–160 мм), *Arca boucardi* (Jousseume, 1894) (длина раковины ~ 4,5–5,5 мм). Моллюски были собраны в бухте Новик (зал. Петра Великого, Японское море, Россия). В эксперименте изучалось влияние на гемолимфу моллюсков следующих материалов: МУНТ 2 вида – МУНТ-2.2, МУНТ-2.3; УНВ 2 вида – УНВ-1.1, УНВ-1.2; КНТ 2 вида – КНТ-1 и КНТ-2;

TiO₂; Au; CdS; ZnS. Все наноматериалы были взяты в концентрациях 1; 10; 100; 250 мг/мл; 500 и 1000 мг/мл.

Все моллюски были помещены в аэрированные резервуары с 50 л морской воды. После 3-дневной акклиматизации производили забор гемолимфы. Для анализа методом проточной цитометрии образцы гемолимфы отбирали из заднего аддуктора в 0,1 М раствор натриевой соли EDTA для предотвращения агрегации гемоцитов. Затем гемолимфу центрифугировали и снимали надосадочную жидкость. К осадку добавляли 1 мл CMFSS и ресуспендировали. Затем гемолимфу повторно центрифугировали и снимали надосадочную жидкость. К осадку добавляли стерильную морскую воду и ресуспендировали. Определяли количество клеток на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с пакетом программ CytExpert v.2.0. Количество клеток в 1 мл гемолимфы составляло 80000

Затем гемоциты разлили в 96-луночный планшет по 50 мкл в лунку (по девять повторений для каждой концентрации и контроля). Затем планшеты оставили в лабораторном холодильнике при температуре +4 °C на 30 мин, чтобы клетки прилипли к планшету. После этого добавляли суспензию наночастиц в объеме 150 мкл и поставили инкубироваться в лабораторном холодильнике при температуре +4 °C. Измерения проводились через 2, 4 и 6 ч. Перед измерением гемоциты были окрашены пропидия йодидом (5 мкмоль/мл); FDA (5 мкмоль/мл); DIOC₆ (5 мкмоль/мл).

Для микроскопического исследования использовался микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением x200 и x600. Для вывода результатов использовалось специализированное программное обеспечение ZEN 2 (Carl Zeiss, Германия). Статистический анализ включал определение средних значений исследуемых параметров и их стандартных ошибок и достоверности различий на уровне значимости $p < 0,05$ с использованием критерия Стьюдента.

Млекопитающие

Мыши линии СВА

Все опыты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской

декларации. Перед выполнением работ всех животных содержали в одинаковых условиях. В эксперименте использовали мышей самцов линии СВА массой 25–30 г, полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Мыши получали цеолит перорально в дозировке 3–5 % от массы тела. Животные были разделены на 17 экспериментальных групп по 8 шт. в каждой, в том числе: "Контроль" – животные, которые не получали цеолит; "Куликов-м", "Куликов-у", "Куликов-н" – мыши, которые получали цеолиты Куликовского месторождения после механической, ультразвуковой и планетарной обработки соответственно; "Вангин-м", "Вангин-у", "Вангин-н" – получали цеолиты Вангинского месторождения с аналогичной обработкой; "Люльин-м", "Люльин-у", "Люльин-н" – получали цеолиты Люльинского месторождения с аналогичной обработкой; "Шивертуй-м", "Шивертуй-у", "Шивертуй-н" – получали цеолиты Шивертуйского месторождения с аналогичной обработкой; "Холин-м", "Холин-у", "Холин-н" – получали холинские цеолиты с аналогичной обработкой. Цеолиты Чугуевского месторождения брались в эксперимент только после механического измельчения.

После опытных мероприятий забирался материал для исследования в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 12.08.77. Из собранного материала делались полутонкие срезы ткани желудка и кишечника, которые окрашивались гематоксилин-эозином. Фотографирование препаратов проводилось на микроскопе Zeiss Axio ObserverA1 (Zeiss, Германия). Статистическая обработка результатов ($n = 30$) велась с использованием программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel. Оценка достоверности различий определяли по t-критерию Стьюдента.

В эксперименте по парентеральному введению использовали мышей самцов линии СВА массой 25–30 г, полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Животные были разделены на 2 группы по 5 особей в каждой. Первая группа – интактные животные. Вторая группа – животные, которым внутримышечно вводили взвесь наноразмерных частиц цеолита. Для приготовления композита с наноразмерными частицами цеолита использовали цеолиты Вангинского месторождения (Амурская обл.), которые измельчали в планетарной мельнице Fritch Pulverisette и помещали

в физиологический раствор (0,058 г на 10 мл раствора). Размер частиц при измерении с помощью лазерной гранулометрии (Fritch Analysette 22) составил 0,1–5,0 мкм.

Взвесь цеолитов вводили мышам в область бедра по 100 мкл взвеси на одно животное (0,058 мг на 1 животное) через сутки в течение 10 дней. Для светооптического исследования образцы мышечной ткани бедра, пахового лимфатического узла, почек, печени и легкого фиксировали в 1 %-ном растворе OsO₄ на фосфатном буфере (рН = 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом «Leica DM», фотографировали с помощью компьютерной программы «Avigion».

Исследование по пероральному введению МУНТ проведено на мышах СВА массой 25–30 г (n = 60; виварий Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН). Материал из разных отделов желудочно-кишечного тракта и почек изучали после перорального введения нанотрубок в течение 1, 2, 3, 4, 5 и 6 дней (табл. 6). Животные всех групп получали стандартный рацион в стандартных условиях освещенности, температуры и влажности. Чтобы исключить влияние эстрогена на пролиферативную активность эпителиоцитов слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, эксперименты проводились только на самцах.

Таблица 6

Распределение мышей СВА по экспериментальным группам

Группа	Дни						Всего
	1	2	3	4	5	6	
Контрольная (интактные)	5	5	5	5	5	5	30
Экспериментальные	5	5	5	5	5	5	30

Исходные нанотрубки МУНТ-2.1 представляли собой спиральную проволоку размером 30–50 мкм. После предварительной дезинтеграции (1 мин) в ультразвуковом аппарате Bandelin Sonopulse 3400 они были назначены животным с кормом. Животные получали корм с использованием нанотрубок в одно и то же время суток в соответствии с циркадными ритмами (один раз в день в качестве теста, 500 мг/кг).

Попытки введения через трубку не увенчались успехом, поскольку водонерастворимые нанотрубки блокировали даже самые большие из доступных пробирок.

Материал для исследования собирали ежедневно в течение тех же часов (12.00) в соответствии с Правилами исследований с использованием экспериментальных животных (12.08.1977). Биопсийные образцы желудка были взяты из кардиального, фундального и антрального отделов в соответствии с золотым стандартом ВОЗ. Полутонкие срезы были окрашены гематоксилином и эозином. Материалы анализировали и обрабатывали под микроскопом Axio Observer A1 (Carl Zeiss) и микроскопом OlympusVx51 с цифровой камерой CD 25.

Исследование по парентеральному введению наночастиц золота было проведено на 35 самцах мышей СВА. Интактные контрольные группы 1 ($n = 5$) содержали вместе с другими группами в аналогичных условиях (температура, влажность, день/ночь и питание). Мышам контрольной группы 2 ($n = 5$) подкожно вводили 0,5 мл изотонического физиологического раствора. Мышам опытной группы 3 ($n = 25$) подкожно вводили 0,5 мл суспензии наночастиц золота (50 %-ное разведение в изотоническом физиологическом растворе). Топография НП и солевых инъекций была одинаковой: задняя поверхность проксимальной трети бедра. Инъекции были сделаны в 10.00 во всех группах, чтобы исключить влияние циркадных ритмов.

Мышей умерщвляли на 2, 3, 4, 5, 6-й день (1 животное из каждой контрольной группы, 5 экспериментальных мышей за период). Мягкие ткани проксимальной трети бедра, включая лимфоидную ткань паховой области, иссекали, а парафиновые блоки готовили стандартным методом. Затем срезы депарафинизировали и обычно окрашивали гематоксилином и эозином. Изображения, полученные под микроскопом Olympus Vx51 с цифровой камерой CD 25, анализировали с использованием оригинального морфометрического программного обеспечения Olympus.

Крысы линии Вистар

Для определения влияния цеолитсодержащих туфов (10–50 мкм) на морфологию внутренних органов при пероральном введении использованы самцы крыс

линии Вистар (масса 180–200 г). Не менее 10 дней перед началом эксперимента крысы получали полноценный пищевой рацион в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977). Они получали минералы с пищей в дозировке 1 % от массы тела в течение 14 дней. Животных разделяли на 2 экспериментальные группы по 8 особей в каждой, в том числе: «Контроль» – животные, которые не получали минералы и «Куликовское» – крысы, получавшие измельченный туф Куликовского месторождения.

Забор материала осуществлялся после наркотизации крысы внутримышечным введением 0,5 мл 5 %-ного раствора кетамина. Блоки фиксировали в 10 %-ном растворе забуференного нейтрального формалина "Histoline" (Элемент, Россия), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в парафин "Histomix Extra" (Био Витрум, Россия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы, окрашивали гематоксилин - эозином, изучали под световым микроскопом "Zeiss Axio Observer A1" (Zeiss, Германия), для фотосъемки – "Axio Cam 3" (Zeiss, Германия) и программу компьютерной морфометрии «Axio Vision 4.2».

При пероральном введении МУНТ, самцов крыс линии Вистар массой 100–200 г содержали в Центре животных Амурской государственной медицинской академии (Благовещенск, Россия). Их содержали в стандартных условиях (температура 21–23 °С, цикл 12 ч/12 ч свет/темнота) со свободным доступом к еде и воде. Они были размещены в просторных клетках, отдельно от других видов. Исследование было одобрено биомедицинским этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Тест в открытом поле давно используется в различных исследованиях с участием лабораторных крыс (Hall, 1934, 1936) и позволяет исследовать все элементы сложного поведенческого акта в условиях умеренного стресса. Этот тест также позволяет оценить эмоциональное состояние животного, потому что он помещен в ранее неизвестную и, следовательно, стрессовую среду (Grigoriev et al., 1998; Латушин и др., 2006; Вдовина и др., 2010; Иванов, Подковкин, 2010). Мы использовали

две группы крыс с массой тела от 180 до 200 г, в каждой группе было по 10 животных. В течение десяти дней экспериментальную группу один раз в день кормили МУНТ-1.1, добавленными в их пищевой рацион в дозе 500 мг/кг.

Взвешенное количество МУНТ-1.1 было смешано с 5 г комбикорма для зерна Grenadir Fer Mix 3 (Blagdorznak, Россия) и сырыми куриными яйцами. Крыс в контрольной группе кормили такой же комбинированной пищей без добавления МУНТ. Испытания проводились в нормальных условиях освещения в одно и то же время каждый день, а именно в 4 ч дня. Открытая полевая арена размером 100×100 см была разделена на 25 квадратных областей с 16 отверстиями, расположенными на площади переходы (рис. 12).

Помеченное животное было помещено в центр открытого поля, где была обозначена начальная зона размером 20×20 см. В течение 3 мин движения всех крыс регистрировались видеокамерами. После испытания каждого отдельного животного поверхность арены в открытом поле несколько раз промывали водой и высушивали.



Рис. 12. Экспериментальная камера для испытаний в открытом поле

Были оценены следующие виды деятельности, включающие исследовательское поведение: спонтанная исследовательская активность, проявляющаяся как исследовательская активность в яме, ориентировочная активность, измеряемая как количество задних ходов, и двигательная активность, оцениваемая путем подсчета того, сколько раз животное пересекало внутренние и внешние квадраты. Был также определен интервал времени до того, как животное покинуло центральную область (скрытое время) и общее время, потраченное на перемещение. Интегральная оценка исследовательского поведения была выражена в виде общего количества баллов. Эмоциональное состояние определяли по уровню тревоги у экспериментальных крыс и оценивали по следующим показателям: общее время пребывания животного в неподвижном состоянии, количество эпизодов груминга и эвакуационная активность (количество болюсов). Интегральная оценка этих показателей определяла уровень тревожности (Буслович и др., 1989; Баталова, 2011). Вторая экспериментальная группа получила МУНТ-1.1.

Физиологическая оценка. Все животные из двух экспериментальных групп и контрольной группы были подвергнуты физиологическому обследованию с использованием теста в открытом поле, теста с возвышенным лабиринтом и универсального теста для решения проблем. Эксперименты по дрессировке и тестированию животных проводились в дневное время.

Тест «возвышенный крестообразный лабиринт» проводился в установке, приведенной на рис. 13. Известно, что возвышенный крестообразный лабиринт (Pellow et al., 1985, 1986; Sandini, 2015) в дополнение к тесту в открытом поле, является эффективным методом оценки активности и стресса мелких животных. Метод основан на боязни врожденной крысы к высоте, открытым областям и ее естественному поведению при исследовании, которое появляется, когда животное встречает новую среду обитания. Испытание на возвышенном крестообразном лабиринте включает систему открытых и закрытых рукавов высотой 77 см и длиной 90 см. Все движения крысы отслеживались с помощью видеокамер. Каждое животное испытывали в лабиринте в течение 3 мин.



Рис. 13. Возвышенный крестообразный лабиринт

Уровень индивидуального стресса у каждой крысы линии Вистар оценивали (Grigor'ev et al., 2008) по следующим показателям: I) время, проведенное в закрытых рукавах, и II) количество актов груминга и болюсов. Исследовательская активность оценивалась по следующим показателям: I) время, проведенное в открытых рукавах, II) время движения и III) количество вертикальных упражнений на стояние и изгиб.

Тест УПК. Поисковая активность крыс и особенности информационного и эмоционального стресса изучались с помощью универсальной проблемной камеры (УПК) (рис. 14) (Григорьев, 1996; Golokhvast et al., 2014). УПК представляет собой шестиугольную пирамиду с прозрачной крышкой и люком для входа крыс. Боковые стенки пирамиды имеют шесть выходов с прозрачными подвесными дверцами, которые контролируются с помощью датчиков, чтобы фиксировать любую дверь, касающуюся животных. УПК может исследовать возможность когнитивной цели у крыс, которая представлена нахождением правильной дверцы коробки, в данном случае для удовлетворения потребностей в пище.

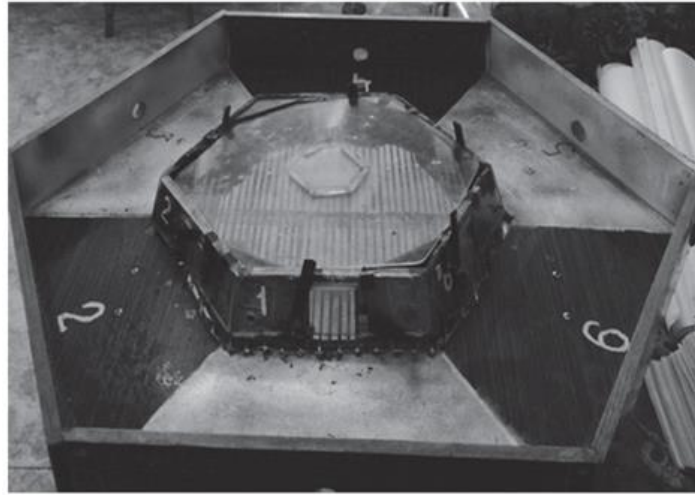


Рис. 14. Универсальная проблемная камера по Н.Р. Григорьеву (1996)

Одна из проблем теста заключается в том, что при каждом новом запуске двери запираются, поэтому цель исследования становится все труднее. Крыса должна решить, куда бежать. Экскурсии считались правильными, когда крыса использовала ранее не использованную дверь, и ошибочными, когда они направлялись к запертой двери. Сумма правильных или противоположных неверных крысиных решений зависела от когнитивных способностей каждой крысы. Специфика метода испытаний была описана ранее (Grigor'ev et al., 2008). Метод позволяет регистрировать и оценивать деятельность по поиску крыс на основе информационно-эмоционального стресса.

Исследовательская деятельность оценивалась в структуре пищевого поведения (на основе сформированного инструментального рефлексивного поведения по поиску корма) и представляет собой безопасный метод оценки когнитивных способностей лабораторных крыс. Перед экспериментальной схемой и в течение 3 дней все крысы прошли предварительную подготовку, которая включала в себя ознакомление с блоком решения проблем и подготовку инструментального рефлекса для обнаружения кормов. После подготовительного периода и начала экспериментальной схемы все испытания проводились в 1, 3 и 10 дней эксперимента. Измерения проводились через один, три и десять дней после начала эксперимента.

Полученные результаты были статистически обработаны с использованием программного обеспечения Statistica 6.1. Значимость наблюдаемых различий оценивали с помощью U-критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

При пероральном введении УНВ на этой экспериментальной установке использовались тридцать самцов крыс линии Вистар в возрасте 3 мес., массой 150–200 г, которые содержались в стандартных условиях вивария («Санитарно-эпидемиологические требования СП 2.2.1.3218-1», М., 2014). Во время эксперимента были соблюдены методические рекомендации по содержанию экспериментальных животных («Методические рекомендации по содержанию экспериментальных животных» МР 1.2.2741-10 «Правила отбора наноматериалов из экспериментальных животных» (утверждено Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей), М., 2014). План эксперимента был утвержден биоэтическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Каждое животное в группе кормили 500 мг/кг массы тела, содержащей углеродные нановолокна (УНВ), в течение 14 дней. Несколько исследований ингаляций и интратрахеальных инстилляций показали распределение многослойных углеродных нанотрубок из легких в плевральную полость (Mercer, 2010). Однако нет четких данных о пероральном воздействии и соответствующем распределении дозы УНВ. Таким образом, доза была выбрана с учетом наших предыдущих исследований (Саяпина и др., 2015; Sayarina et al., 2016). УНВ смешивали с пищей (стандартный комбикорм), а животных проверяли на предмет потребления. Пищу взвешивали, прежде чем предоставить крысам. Животных помещали в отдельные клетки для кормления кормом, смешанным с УНВ (каждое животное находилось в отдельной клетке), и их содержали в этой клетке до тех пор, пока они не съедали всю предоставленную пищу с УНВ. После этого крыс отправляли обратно в домашнюю клетку, где не было пищи (лишение пищи). Пищу с УНВ давали с 4-го дня до первого поведенческого теста. В ходе эксперимента животные потеряли 10 % своего массы. Животных разделили на 3 группы исследования, каждая из которых состояла из 10 животных. Контрольная группа получала стандартный корм без добавок, в одной группе крыс кормили кормом с УНВ-2.2, а последняя группа получала

УНВ-2.1. В дни поведенческого тестирования кормление проводили после эксперимента.

Методы тестирования врожденных форм поведения. Обследованные крысы и животные контрольной группы изучались в системах поведенческих тестов. Для оценки врожденного поведения мы использовали тест на открытое поле и тест возвышенный крестообразный лабиринт (методика проведения и оценки аналогично эксперименту с УНТ). Обработка животных и эксперименты проводились в дневное время. Поведенческие тесты проводились 3 раза (1-й, 3-й и 10-й день испытаний) и начинались на 4-й день получения УНВ.

Методы тестирования усвоенных форм поведения (исследовательская активность). Эта категория поведения была протестирована с помощью проблемной камеры Григорьева (Grigor'ev et al., 2008; Menachem, 2013). Исследовательская деятельность животных, а также информация о познании и эмоциональном стрессе были оценены по методике проведения и оценки, аналогичной эксперименту с УНТ.

Измерения интерлейкина. Использовали метод забора крови из хвостовой вены. Мы использовали наборы (диагностикумы) ОАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) для каждого типа интерлейкинов. Образцы крови были взяты из хвостовых вен голодных крыс утром 11-го дня. Образцы сыворотки хранили замороженными при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Концентрации в крови ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1, ИЛ-10, ИЛ-18 определяли количественно методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) в соответствии с Протоколы изготовителя и результаты поглощения для каждой пластины были измерены с использованием ELIS Aplate reader (Biochrom, UK). Во всех образцах были измерены имплантаты.

Статистические методы. Компаративный анализ был выполнен по t-критерию Стьюдента в компьютерной программе STATISTIKA 6.0. Сравнительный анализ исследовательской активности и уровней тревожности между экспериментальными группами был проведен с помощью t-критерия Стьюдента в отношении небольшого размера выборки, который не показал нормального распределения. Уровни интерлейкина в группах сравнивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Когда $p < 0,05$, различия считались статистически значимыми. Более того, сравниваемые группы были независимы друг от друга и наблюдалась довольно высокая изменчивость.

Глава 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

Проведенные нами (Голохваст и др., 2011; Anisimova et al., 2015; Pikula et al., 2018, 2020) и другими исследователями (Бричкин, 2011; Yokel et al., 2019) физико-химические исследования наночастиц позволили выделить их основные характеристики, влияющие на биологические процессы, определяющие токсичность. Важно отметить, что согласно цели и задачам диссертации, мы рассматривали физико-химические характеристики наночастиц с точки зрения их воздействия не только на отдельные клетки и организмы. Важно было изучить наноматериалы как новые загрязнители окружающей среды, определить их влияние на пищевые цепи и оценить экологические риски. В результате анализа мировой литературы и собственных данных можно выделить наиболее важные характеристики наночастиц, определяющие их экологические свойства.

«Слабая» биотрансформация наночастиц

В настоящее время имеются тысячи сообщений, что наночастицы обладают более выраженными токсическими свойствами, чем микрочастицы, сделанные из того же материала (Lu et al., 2015; Miller et al., 2017; Tian et al., 2019). Объясняется это способностью наночастиц проникать через любые биологические мембраны и барьеры, накапливаться в тканях и органах (Filippi et al., 2015; Ziglari et al., 2020), нанося длительное токсическое воздействие. Наночастицы из-за своих малых размеров могут накапливаться в организмах животного и растительного происхождения, а также легко распространяться по трофической цепи: почва → растения → животные → человек (Латышевская, Стрекалова, 2011; Попов, 2013; Ибраев и др., 2015). Важно отметить, что малый размер наночастиц не дает клеткам «переваривать» их без последствий. Часто наночастицы просто накапливаются в выводящей системе или в паренхиме органов (Adeyemi et al., 2019).

Химическая деградация УНМ (в том числе углеродные нанотрубки, графен и оксид графена) происходит путем фотодеградациии (реализуется при участии света)

(Hou et al., 2015; Frank et al., 2020) и химической деградации (реализуется под действием активных форм кислорода, в том числе перекиси водорода) (Xing et al., 2014; Peng et al., 2020). Явление биотрансформации наноматериалов существует, но работ по данной теме немного (Allen et al., 2008; Kagan et al., 2010, 2014; Hou et al., 2016; Litasova et al., 2016; Navarro et al., 2017; Petersen et al., 2019; Dong et al., 2020; Piotrovskiy et al., 2020), поэтому пока нет полного понимания каким образом организм может утилизировать и обезвреживать наночастицы (Zhou et al., 2020).

Также стоит отметить, что большинство этих работ касается углеродных наночастиц – нанотрубок и фуллеренов (Peng et al., 2020) и наиболее изученным является путь разложения однослойных нанотрубок миелопероксидазой нейтрофилов (Kagan et al., 2014). В целом именно сверхмалые размеры наночастиц, определяющие слабую биотрансформацию с одной стороны и высокую токсичность с другой стороны, являются одними из наиболее важных характеристик, которые помогают оценивать экологические риски.

Текстурные (удельная поверхность, число микро- и мезопор, гидрофильность/гидрофобность)

От характеристик поверхности, в целом зависит, смачивается или не смачивается поверхность материала, а значит плавает он на поверхности воды или сразу тонет; сорбирует ли материал из среды тяжелые металлы, катионы/анионы, биомолекулы или остается инертным. Анти- или прооксидантные свойства частиц наноматериалов (на примере, минералов с нано- и микропорами), по мнению некоторых авторов (Ivkovic et al., 2004), зависят от их способности сорбировать активные формы кислорода и другие радикалы в поверхностных порах. В целом текстурные характеристики, как одни из важнейших для прогнозирования биологических и токсических свойств, рассматриваются и другими авторами (Semenov et al., 2017). На примере цеолитов, как минералов с нано- и микропорами, было установлено (Голохваст и др., 2010), что текстурные характеристики поверхности могут существенно менять биологические свойства.

Известно, что микрочастицы некоторых минералов (например, кварца) при попадании в живой организм выступают в качестве источника свободных радикалов (Середенин, Дурнев, 1998). Скорее всего, речь идет не о механическом повреждении, а о физико-химическом контакте мембраны клетки с поверхностью минералов через процессы перекисного окисления липидов как сигнальную систему, и в зависимости от типа минералов и их физико-химических свойств это проявляется в разных ответных реакциях – от нейтральной до канцерогенной (например, реакция на асбест и эрионит).

Площадь удельной поверхности и поверхностные структуры мы изучили на примере углеродных нанотрубок и нановолокон. Образцы МУНТ и УНВ дополнительно изучались методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рис. 15). Как мы видим на рис. 15, во всех спектрах присутствуют две типичные полосы углеродного материала: D-полоса (1100–1400 см^{-1}) и G-полоса (1575–1600 см^{-1}). Стоит отметить, что образцы МУНТ-2.2 имели более регулярную структуру, а G-полоса обеспечивала хорошее представление об углероде, связанном с sp^2 , который присутствует в конфигурациях плоских листов, которые включают углерод, связанный с sp^2 , углеродных нанотрубок (рис. 15, а).

Кроме того, большая разница в интенсивности сигнала указывает на многослойную упорядоченную структуру. Образцы МУНТ-2.1 характеризуются менее упорядоченной структурой (рис. 15, б). D-группа (1308 см^{-1}) может быть отнесена к артефакту или дефекту, который происходит от краевых конфигураций в графене, где нарушается конфигурация плоского листа. Это обнаружено на краю открытого конца углеродной нанотрубки, где расположены дефекты. Иногда также можно наблюдать некоторый связанный с sp^2 аморфный углерод, способствующий этой полосе. Линия при 1605 см^{-1} , соответствующая D'-полосе, также указывает на связанный с sp^2 углерод, который представляет моды поверхностных дефектов. Небольшая разница в интенсивности сигнала между полосой D (1308 см^{-1}) и полосой G (1583 см^{-1}) указывает на количество слоев в структуре между 2 и 4.

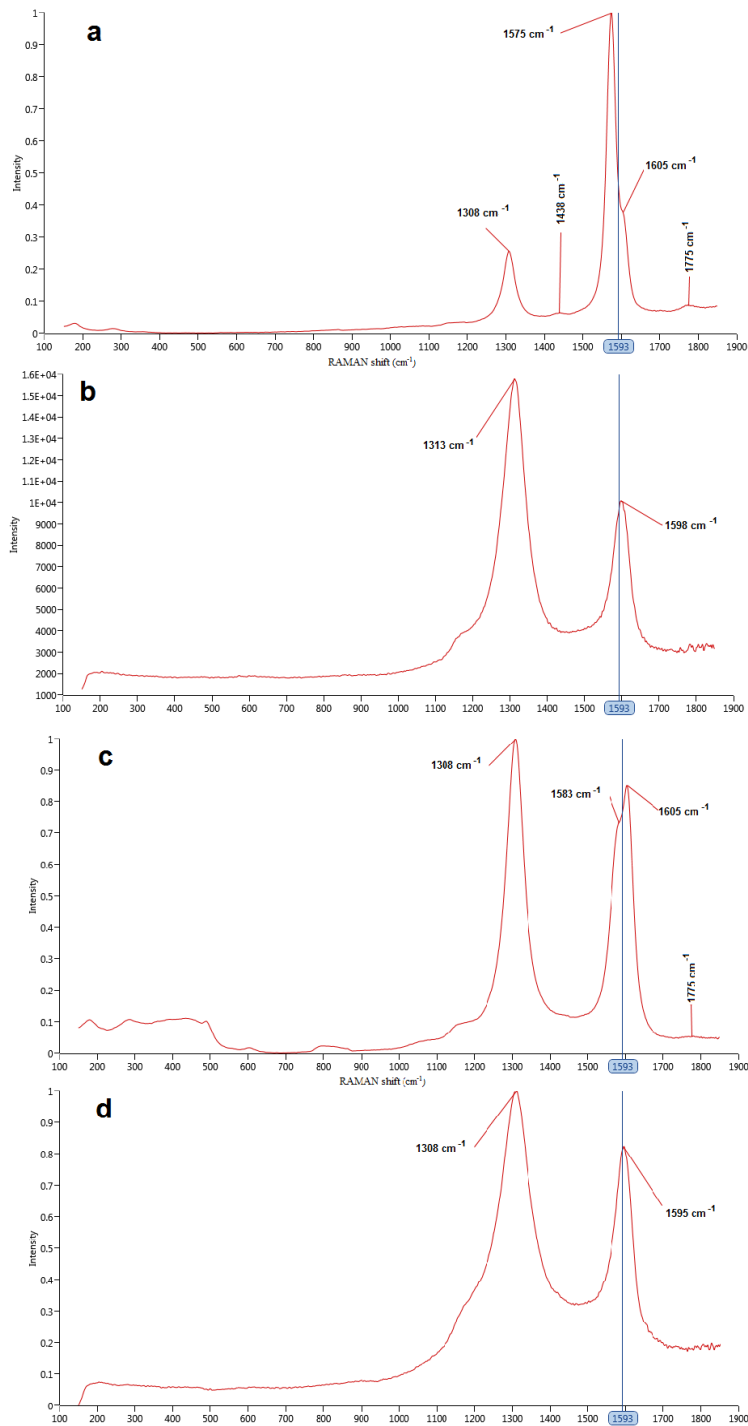


Рис. 15. РАМАН-спектры углеродных нанотрубок (МУНТ) и углеродных нановолокон (УНВ): **a** – МУНТ-2.2; **b** – МУНТ-2.1; **c** – УНВ-1.1; **d** – УНВ-1.2

Спектр комбинационного рассеяния углеродных нанотрубок имеет пик при 1575 см^{-1} , что соответствует числу одиночных нанокристаллов графита. Существует также пик 1605 см^{-1} , соответствующий многослойным углеродным нанотрубкам (рис. 15, а). Большое количество пиков в области радиального дыхания

(RBM) в низкочастотной области спектра (пики при 178 см^{-1} , 278 см^{-1} , 357 см^{-1} , 464 см^{-1}) указывают на большое количество нанотрубок в образце, имеющем двойной слой (рис. 15, b).

Исследование УНВ с помощью раман-спектроскопии показало сдвиг сигнала *D*-пика с 1299 см^{-1} и *G*-пика с 1953 см^{-1} до 1313 см^{-1} и 1598 см^{-1} у УНВ-1.1, что свидетельствует об увеличении количества упорядоченных связей и уменьшении количества дефектов (рис. 15, c-d). В то же время увеличение интенсивности сигнала – с 1313 см^{-1} к сигналу 1598 см^{-1} – свидетельствует о многослойности упорядоченной структуры. Согласно рамановской спектрометрии, поверхность УНВ упорядочена и представлена кристаллическим углеродом, который, бесспорно, гидрофобен, в отличие от аморфного. Как известно, частицы оседают, когда имеют малую удельную поверхность и плотность частицы больше плотности воды. Следовательно, разволокнение приводит к увеличению удельной поверхности, компактизация частиц уменьшается и в совокупности с гидрофобностью кристаллического углерода позволяет частицам оставаться во взвешенном состоянии.

Способность к агрегированию

Данное свойство наноматериалов важно с экологической точки зрения, поскольку именно оно определяет их аэро- и гидродинамические характеристики в разных средах. Если наночастицы быстро агрегируют, то они менее опасны для организмов, чем одиночные наночастицы, поскольку агрегат наночастиц диаметром 50–150 мкм не может попасть внутрь клетки и проходит транзитом через кишечный тракт (Anisimova et al., 2015).

Мы изучали поведение синтетических наночастиц (на примере МУНТ, УНВ, КНТ, Au, TiO_2 , CdS, ZnS) в водной среде. Так по результатам спектрофотометрического анализа гидродинамики суспензии нанотрубок в сверхчистой воде мы обнаружили, что МУНТ-2.6 и МУНТ-2.3 в сверхчистой воде в концентрации 100 мг/л начинали быстро оседать на дно в первые часы, а через 24 ч они практически полностью попадают на дно кюветы и отсутствуют во взвешенном состоянии (рис. 16).

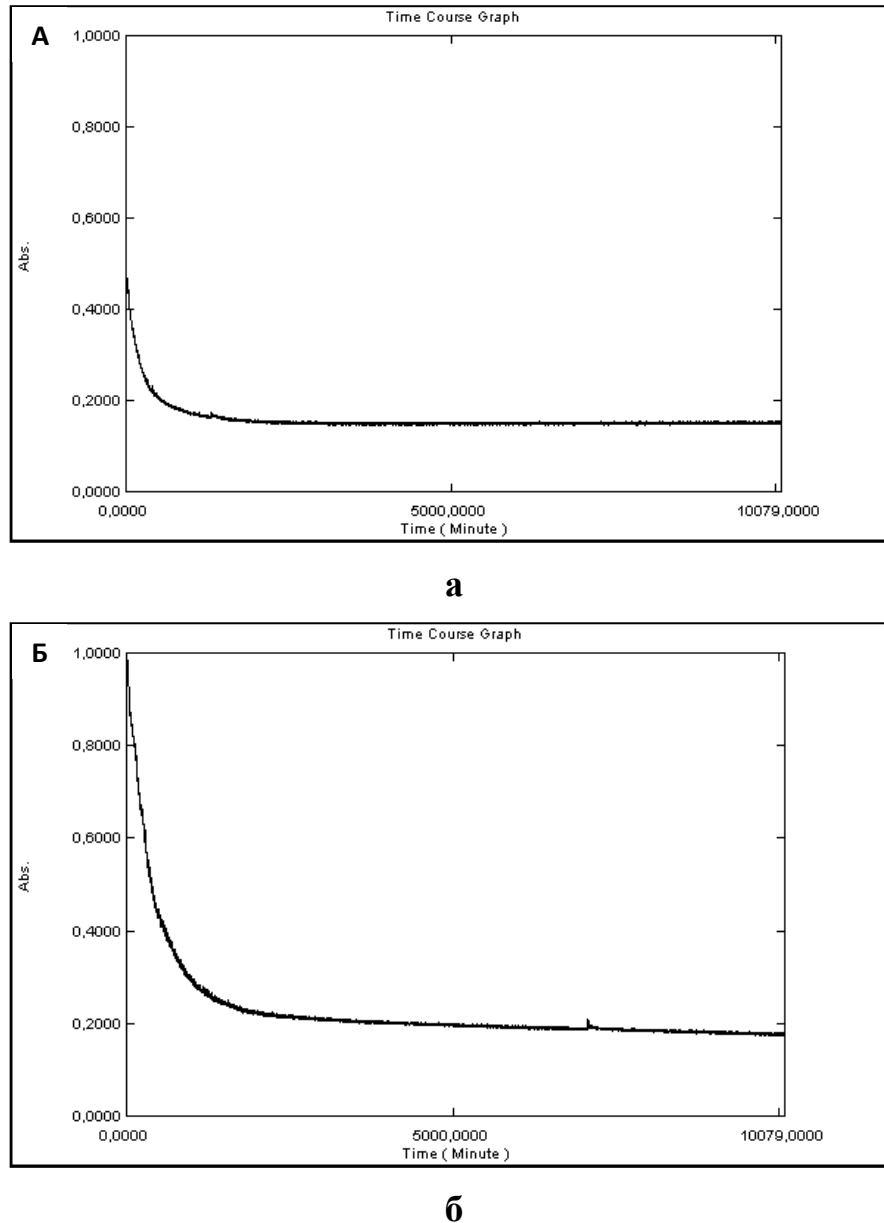


Рис. 16. График светопоглощения раствора: **а** – МУНТ-2.6 и **б** – МУНТ-2.3 при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10800 точек) в дистиллированной воде

Как видно из полученных данных, скорость осаждения МУНТ марки МУНТ-2.6 выше, чем МУНТ-2.3, что позволяет нам сделать вывод о наличии некоторых факторов, влияющих на осаждение МУНТ.

Динамика осаждения УНВ незначительно отличается от осаждения МУНТ: быстрое снижение концентрации наночастиц в 1–2 сут (рис. 17).

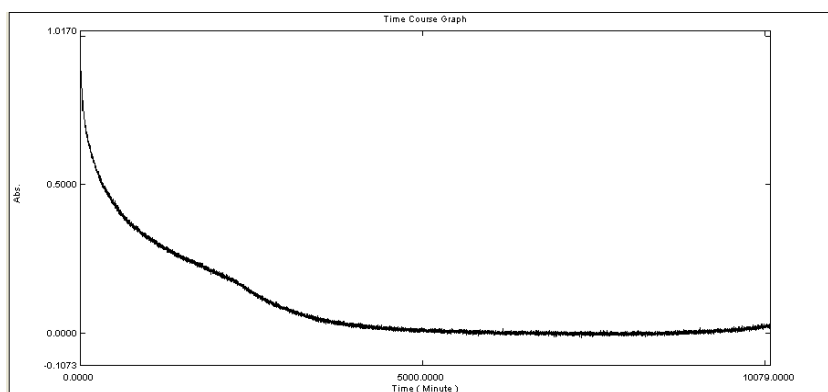


Рис. 17. График светопоглощения раствора УНВ-1.2 при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10800 точек) в дистиллированной воде

Что касается КНЧ, то разные наночастицы показали разную динамику и скорость осаждения наночастиц. Скорость осаждения КНТ-2 совпадает со скоростью осаждения МУНТ и УНВ (рис. 18).

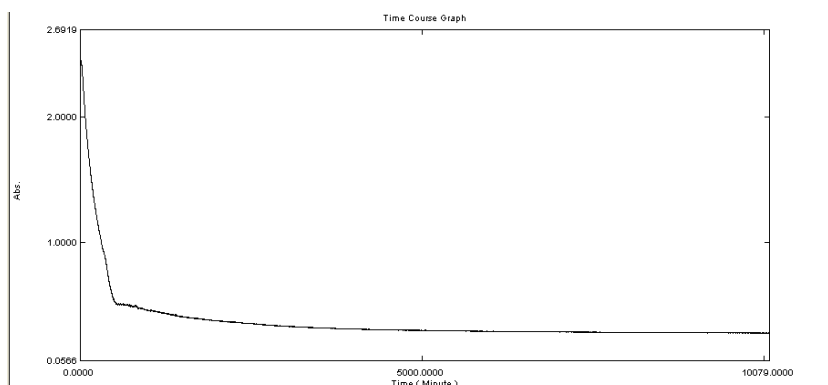


Рис. 18. График светопоглощения раствора КНТ-2 при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10800 точек) в дистиллированной воде

Однако совершенно другая динамика осаждения наблюдается у КНТ-1. Осаждение данного вида наночастиц происходило медленнее и продолжалось на протяжении всей недели (рис. 19).

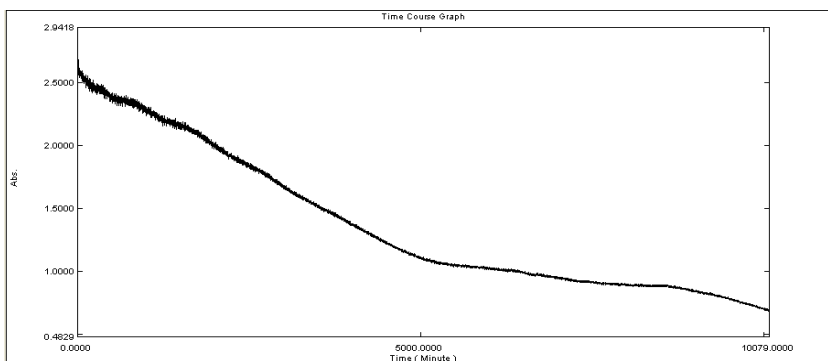


Рис. 19. График светопоглощения раствора КНТ-1 при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10800 точек) в дистиллированной воде

Такая разница, по нашему мнению, обусловлена физико-химическими свойствами наночастиц, а также отличием их формы и размера.

Скорость и динамика осаждения в воде наночастиц металлов и оксидов металлов значительно отличается от предыдущих образцов. Во-первых, они осаждаются гораздо медленнее чем МУНТ, УНВ, КНВ, и даже к концу измерения большое количество наночастиц находится во взвешенном состоянии. Во-вторых, кривая осаждения не такая пологая и гладкая как в предыдущих образцах, зафиксировано большое количество пиков (рис. 20).

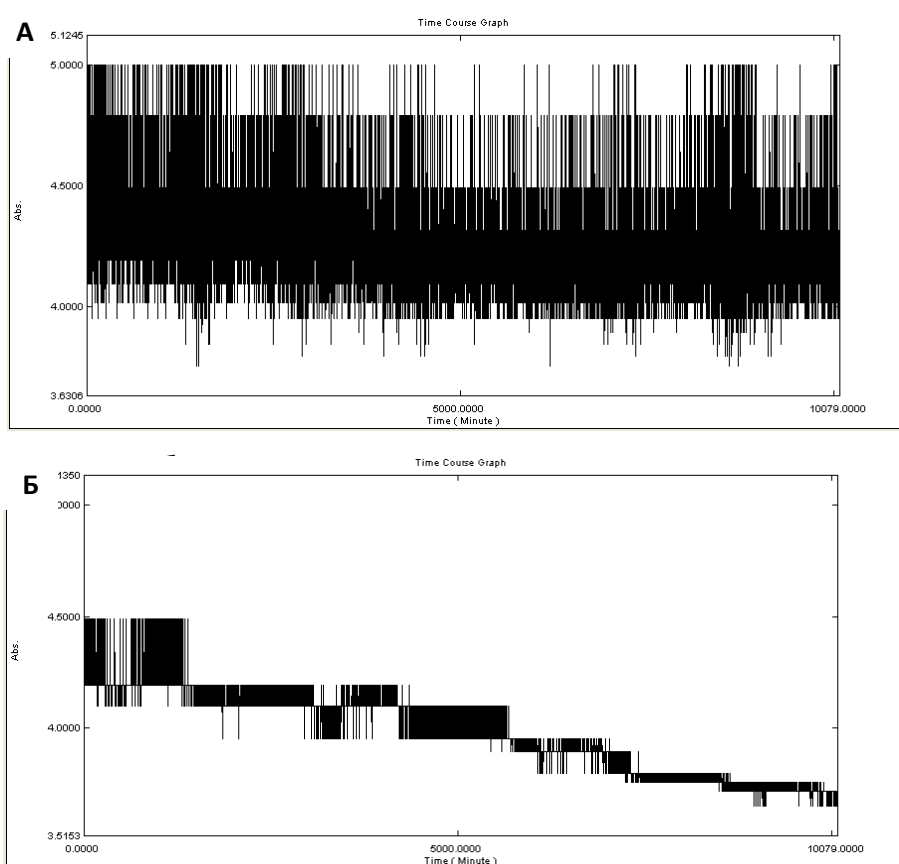


Рис. 20. График светопоглощения раствора: **а** – Au и **б** – TiO₂ при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10800 точек) в дистиллированной воде

Осаждение квантовых точек CdS и ZnS также отличается от осаждения остальных наночастиц. Данный тип наночастиц осаждался очень быстро. Практически все наночастицы осели на дно в течение первых часов (рис. 21).

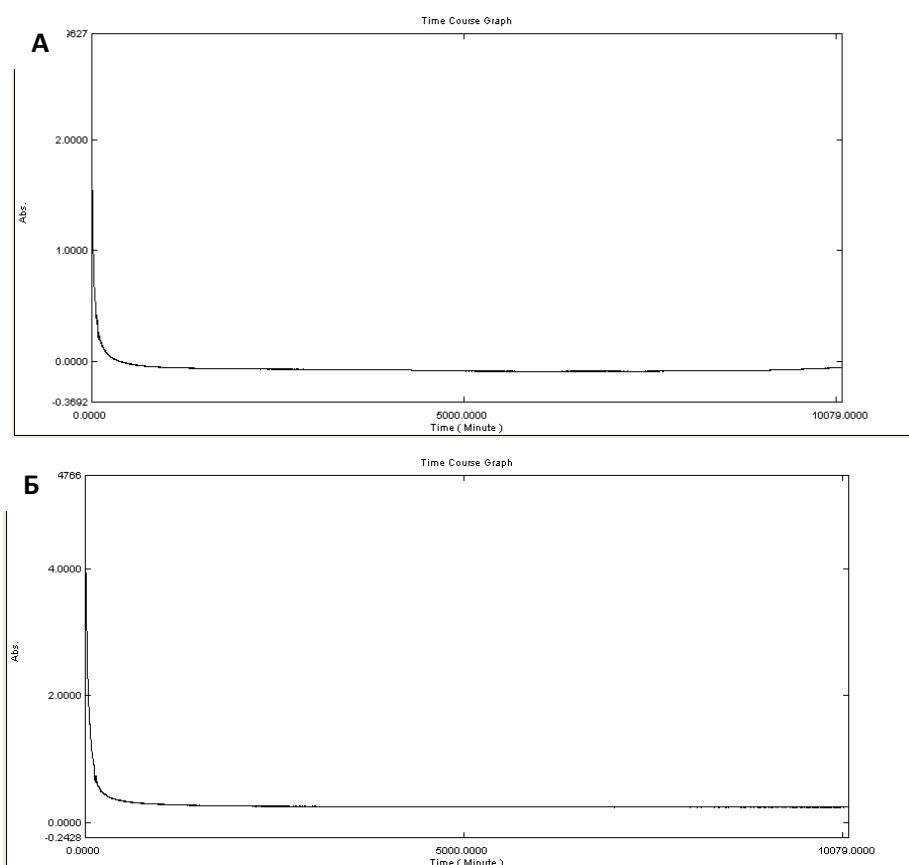


Рис. 21. График светопоглощения раствора: А – CdS и Б – ZnS при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10800 точек) в дистиллированной воде

Для попытки теоретически рассчитать скорость осаждения мы приняли форму частиц сферической в силу невозможности определения точной массы и геометрических параметров по электронно-микроскопической фотографии. В этом случае, с некоторыми допущениями, скорость осаждения частиц можно рассчитать по уравнению Стокса. При отмывании нанотрубок происходит удаление неорганических примесей, а также незначительная функционализация поверхности (Хабашеску, 2011). При прокаливании с поверхности МУНТ удаляются различные органические функциональные группировки, а также неорганические соединения (Kuznetsov et al., 2010). Наличие примесей подтверждено фотографией (рис. 22) электронного микроскопа во вторичных электронах.

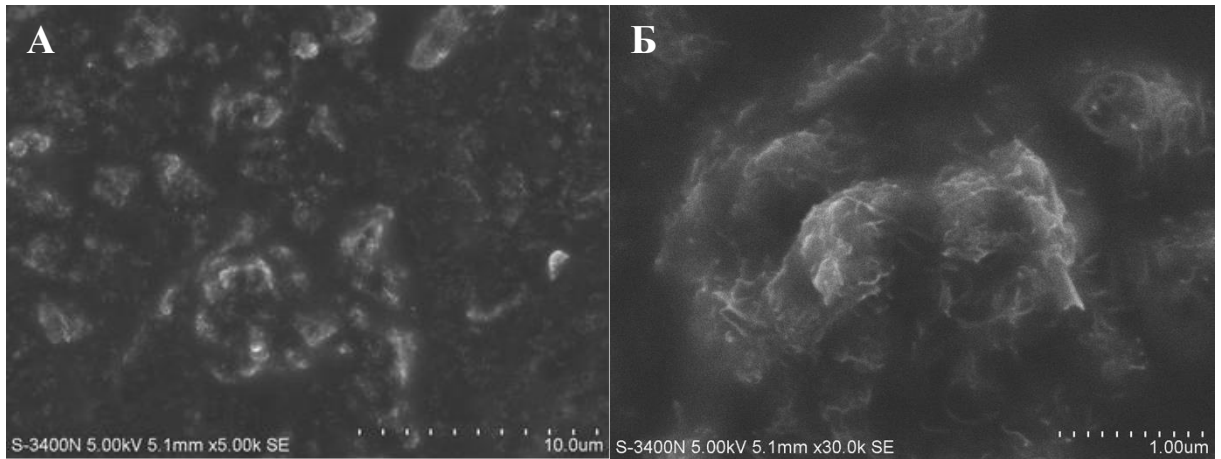


Рис. 22. МУНТ-2.3 до УЗ диспергирования. Сканирующая электронная микроскопия во вторичных электронах: **А** – увел. 5000, **Б** – увел. 30000

Светлые участки при исследовании во вторичных электронах свидетельствуют о наличии тяжелых фракций (в нашем случае металлов) на поверхности МУНТ. Изначально МУНТ представляют собой крупные агрегаты со средним размером от 20 до 150 мкм. После перевода в раствор нанотрубки обрабатывались ультразвуком с целью уменьшения размера агрегатов, который достигал в среднем от 1 до 50 мкм (рис. 23 и 24).

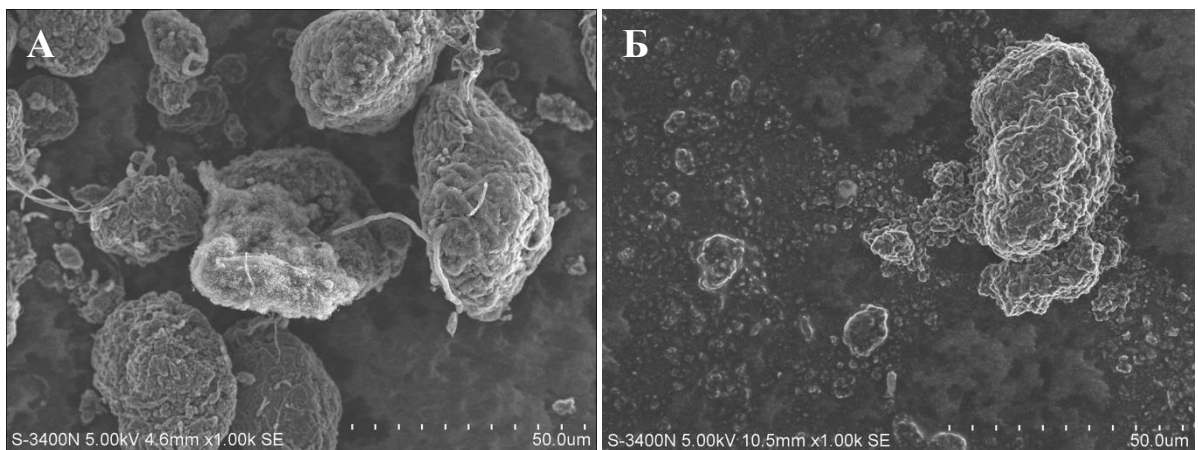


Рис. 23. МУНТ-2.3 до (**А**) и после (**Б**) УЗ-диспергирования. Сканирующая электронная микроскопия во вторичных электронах. Увел. X1000

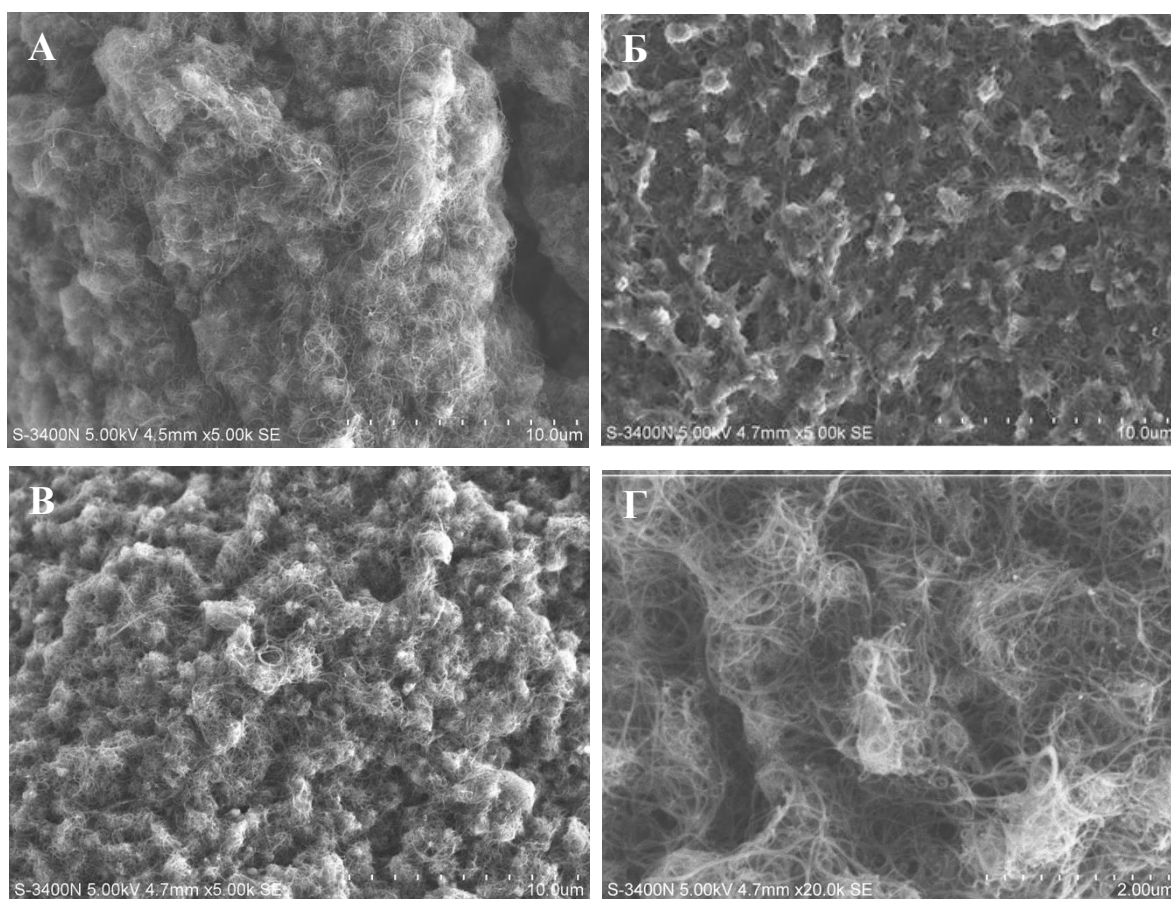


Рис. 24. МУНТ-2.6 до (А) и после (Б) УЗ-диспергирования и после 2 нед. (В и Г). Сканирующая электронная микроскопия во вторичных электронах. А, Б и В – увел. x5000, Г – увел. x20000

Изменялась и микроструктура МУНТ (на примере МУНТ-2.3) (рис. 25). Такое поведение МУНТ можно объяснить тем, что, исходя из размеров частиц, система «вода-МУНТ» является коллоидной. В прокаленных образцах встречаются такие примеси, как Fe, Ca, Si, вследствие чего коллоидные частицы имеют на поверхности избыток положительных или отрицательных ионов за счет окисления примесей, таким образом, обладают электрическим зарядом.

Изменялась микроструктура МУНТ и в морской воде (рис. 26). Это связано с быстрой агрегацией наночастиц и образованием агломератов разных размеров: от 10 до 200 мкм, которые оседают на дно под собственным весом.

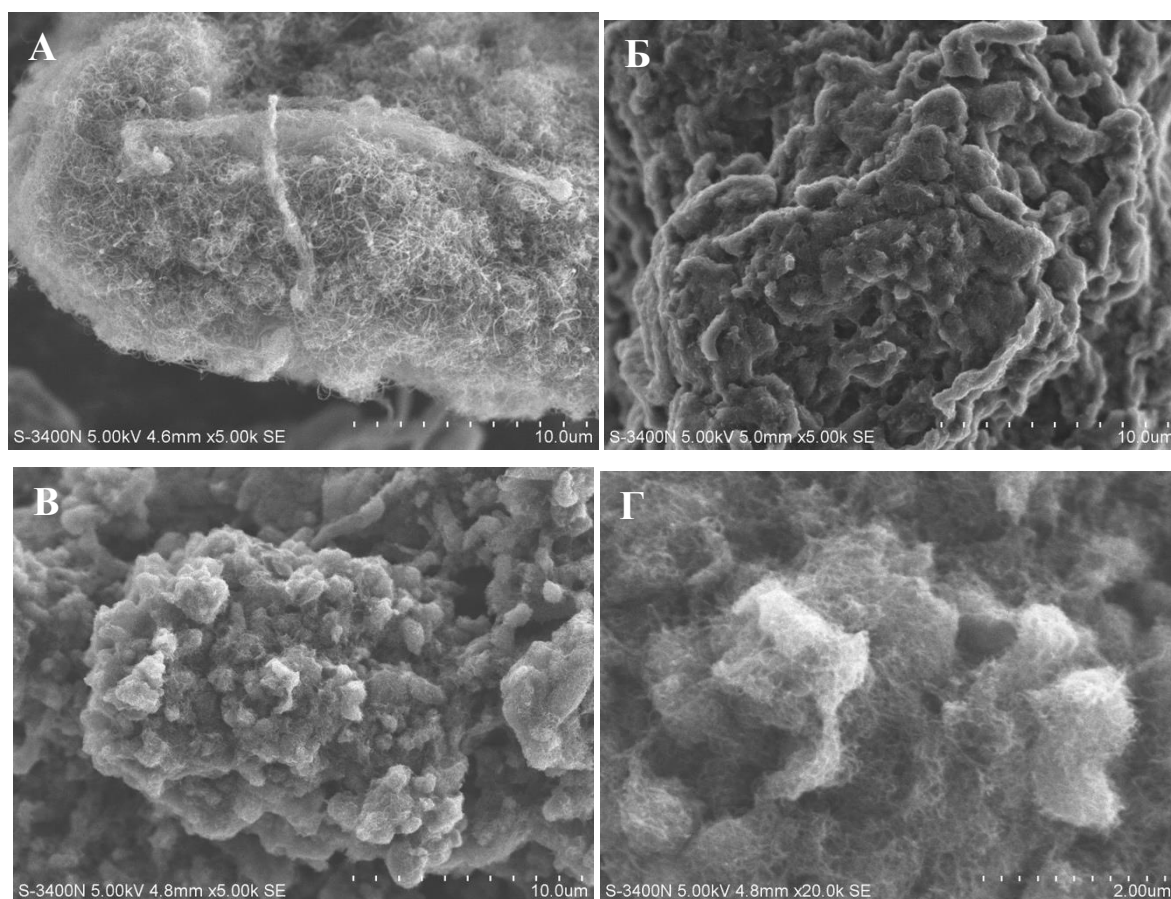


Рис. 25. МУНТ-2.3 до (А) и после (Б) УЗ диспергирования, после 2 нед. (В и Г). Сканирующая электронная микроскопия во вторичных электронах: А, Б и В – увел. $\times 5000$, Г – увел. $\times 20000$

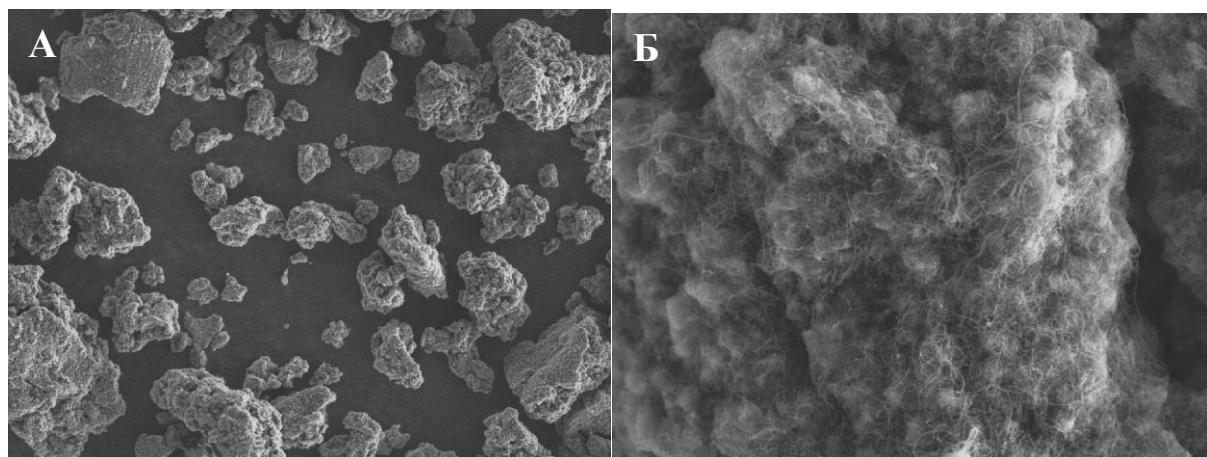


Рис. 26. Агрегаты МУНТ, образованные в морской воде. Сканирующая электронная микроскопия вторичных электронов: А – панорамный вид и Б – поверхность одного из блоков. Увеличение: А – $200\times$; Б – $5000\times$

В зависимости от гидрофобности или гидрофильности поверхности наноматериала зависит время их нахождения во взвешенном состоянии, что влияет на то, в каком компоненте пищевой цепи они окажутся.

Безусловно, имеются и другие физико-химические характеристики наноматериалов, которые необходимо учитывать для прогнозирования их токсических свойств при синтезе *de novo* или оценке экологических рисков. Это, конечно, следующие параметры материалов:

- примеси токсичных металлов, оставшиеся после синтеза (Gatoo et al., 2014). Несмотря на очистку (кислотную или выжигание) остатков катализаторов или компонентов синтеза в наноматериалах часто содержатся токсичные примеси, которые могут определять отрицательное действие на организмы (Vitkina et al., 2016);
- концентрация кислотных центров (центров Льюиса и Бренстеда) у металлических наночастиц и композитов. Эти центры – координационно-ненасыщенные поверхностные атомы (обычно металла, например алюминия) с локализованным положительным зарядом, которые проявляют выраженные каталитические свойства (Nel et al., 2006; Lin et al., 2012). Они могут играть большую роль в закреплении крупных биологических молекул и в превращениях любых органических субстратов;
- поверхностный потенциал (дзета-потенциал). Заряд поверхности наноматериалов, по мнению ряда авторов (Kubota et al., 2008; Голохваст и др., 2011), при контакте с мембраной клетки однозначно меняет ионный баланс в примембранной области. Можно предположить, что эффект будет зависеть от силы и площади заряда. Так, например, большинство наночастиц имеют аномально высокий заряд и оказывают ярко выраженное токсическое действие (Nel et al., 2006).

Глава 4. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

4.1. Воздействие углеродных наночастиц на одноклеточные организмы

Воздействие многослойных углеродных нанотрубок на одноклеточные организмы

Мы исследовали влияние МУНТ на организмы из группы продуцентов: типичные представители фитопланктона Японского моря (*Attheya ussuriensis*, *Heterosigma akashiwo*, *Chaetoceros muelleri*, *Porphyridium purpureum*, *Pseudonitzschia pungens*, *Isochrysis galbana*). Так как продуценты являются первым звеном в любой пищевой цепи, нашей задачей было оценить экологическое влияние на них различных видов наноматериалов с возможным ранжированием этого влияния.

Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC₆ снижается на 50 % (EC₅₀) в сравнении с контролем. Величины EC₅₀, полученные на основе данных проточной цитометрии и рассчитанные в программном пакете GraphPad Prism 7.04, представлены в (табл. 7–10).

Результаты теста на ингибирование роста водорослей *H. akashiwo* показали, что острая токсичность всех образцов зависела от дозы (рис. 27). Образец МУНТ-2.2 проявлял большую ингибирующую активность в отношении роста водорослей *H. akashiwo*, чем МУНТ-2.1. Наиболее токсичным образцом с острой и хронической токсичностью были МУНТ-2.2. Наблюдение с помощью оптической конфокальной микроскопии показало, что число клеток с неправильной формой под воздействием МУНТ-2.2 было минимальным (рис. 28, а), в то время были более деформированные клетки под действием МУНТ-2.1 (рис. 28, б) с преобладанием D-группы в структура (рис. 28, б).

Результаты биоиспытаний МУНТ на микроводорослях *A. ussuriensis*

Твердые частицы	Выживаемость, EC_{50}^* (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC_{50}^* (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC_{50}^* (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
МУНТ-2.1	214,8 (203,5–227,0)	~359,8	–	29,8 (29,3–30,3)	24,3 (23,9–24,6)	27,4 (26,9–27,8)	23,4 (23,2–23,7)
МУНТ-2.2	195,8 (194,5–227,0)	~344,4	~560	56,2 (54,2–58,3)	42,1 (41,6–52,8)	81,4 (78,2–84,7)	52,7 (51,4–54,1)

* Здесь и в табл. 7–10 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

** Здесь и в табл. 7–10 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC₆, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.

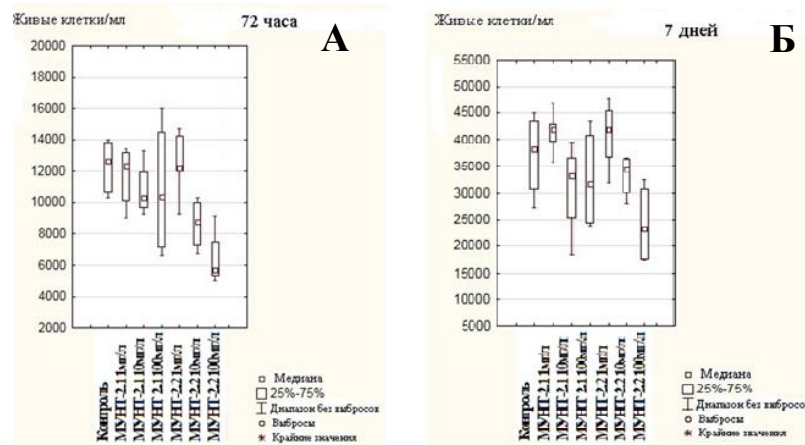


Рис. 27. Выживание морских микроводорослей *H. akashiwo* в течение 72 ч (А) и 7 дней (Б) при воздействии различных концентраций углеродных нанотрубок (МУНТ) при 20 °С и 12 : 12 ч светло-темный цикл

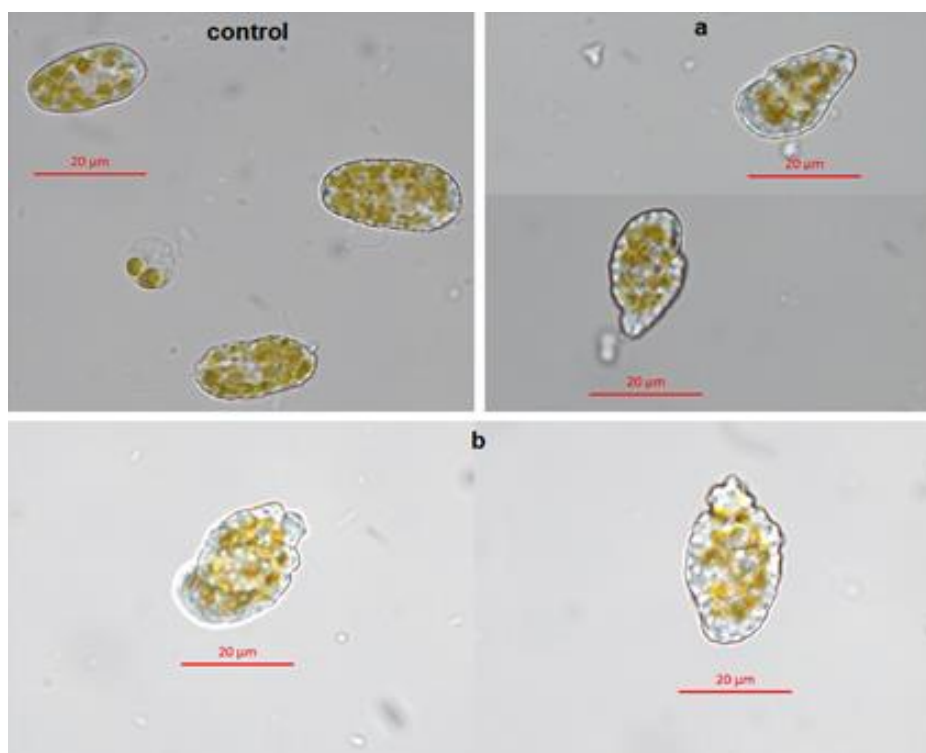


Рис. 28. Конфокальная микроскопия морских микроводорослей *H. akashiwo* при влиянии МУНТ после 7 дней эксперимента при экспозиции 100 мг/л: **a** – МУНТ-2.2; **b** – МУНТ-2.1.

Влияние 2 видов МУНТ на флуоресценцию хлорофилла *a* 4 видов микроводорослей представлено на рис. 29, (за 100 % принято измерение группы контроля для каждого вида водорослей).

Таблица 8

Результаты биоиспытаний МУНТ на микроводорослях *H. akashiwo*

Твердые частицы	Выживаемость, EC_{50}^* (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC_{50}^* (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC_{50}^* (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
МУНТ-2.1	123,1 (121,0–125,2)	> 1000	~1000	55,1 (53,4–56,4)	38,4 (38,7–40,1)	39,6 (38,9–40,4)	21,6 (21,4–21,7)
МУНТ-2.2	154,3 (153,7–154,9)	> 1000	~855	83 (78,9–87,3)	40,9 (40,3–41,5)	65,2 (63,1–67,5)	37,4 (36,4–38,3)

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
МУНТ-2.1	124,2 (119,0–129,7)	~313	~318	105,8 (100,5–111,6)	~733	38,8 (38,0–39,7)	60,9 (58,8–63,1)
МУНТ-2.2	98,4 (93,8–103,2)	> 1000	~680	45,8 (45,1–46,6)	136,5 (131,7–141,5)	60,4 (60,0–60,8)	39,6 (38,9–40,4)

У *H. akashiwo*, углеродные нанотрубки МУНТ-2.2 показали максимальное снижение уровня флуоресценции хлорофилла для данной водоросли. Для *C. muelleri* увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла отмечено для образцов МУНТ-2.1 при концентрации 100 мг/л. Изменение размеров микроводорослей показано на рис. 30.

Таблица 10

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
МУНТ-2.1	38,5 (37,6–39,5)	28,7 (28,1–29,3)	36,1 (35,2–37,0)	82,7 (80,9–84,6)	~423	53,9 (53,4–54,5)	208,6 (202,9–214,5)
МУНТ-2.2	42,2 (37,6–39,5)	178,3 (175,8–180,9)	~415	16,5 (16,1–16,8)	78,6 (75,7–81,5)	213,2 (209,7–216,8)	86,8 (84,6–89,1)

Pseudo-nitzschia pungens (клон PP-07) реагирует на присутствие в среде нанотрубок замедлением темпов деления клеток. Если в контроле, во временном промежутке от 0 до 48 ч происходит постепенное увеличение концентрации клеток за счет митотических делений, то в экспериментальных группах концентрация в поле зрения снижается, что, вероятно, свидетельствует о неблагоприятном воздействии нанотрубок на развитие микроводоросли (рис. 31).

По всей видимости, высокая концентрация наночастиц влияет и на двигательную активность этих микроводорослей. Так, в контрольной группе в поле зрения

фиксируются около 20–25 движущихся клеток из 100, тогда как при контакте с наночастицами в течение 24–36 ч (10 мг/мл) их количество снижается до 5–7 кл. из 100 в поле зрения.

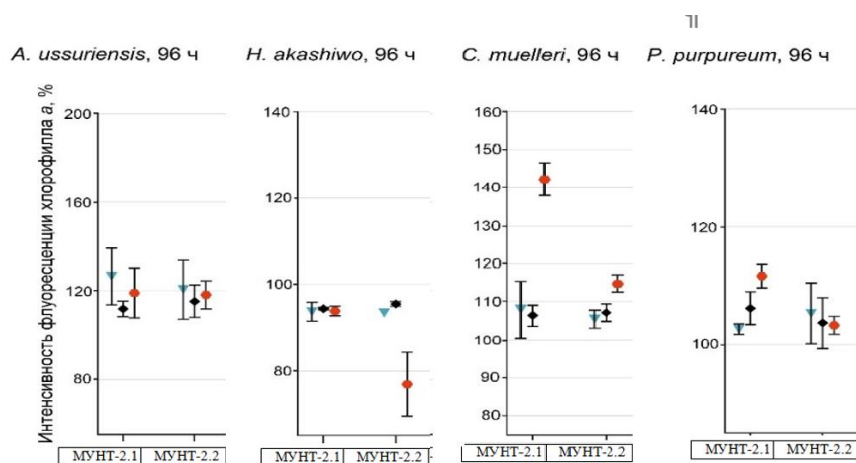


Рис. 29. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* четырех видов морских микроводорослей при воздействии исследуемых наночастиц (96 ч)*. * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (символом отмечено значение медианы, границы доверительного интервала показаны на графиках)

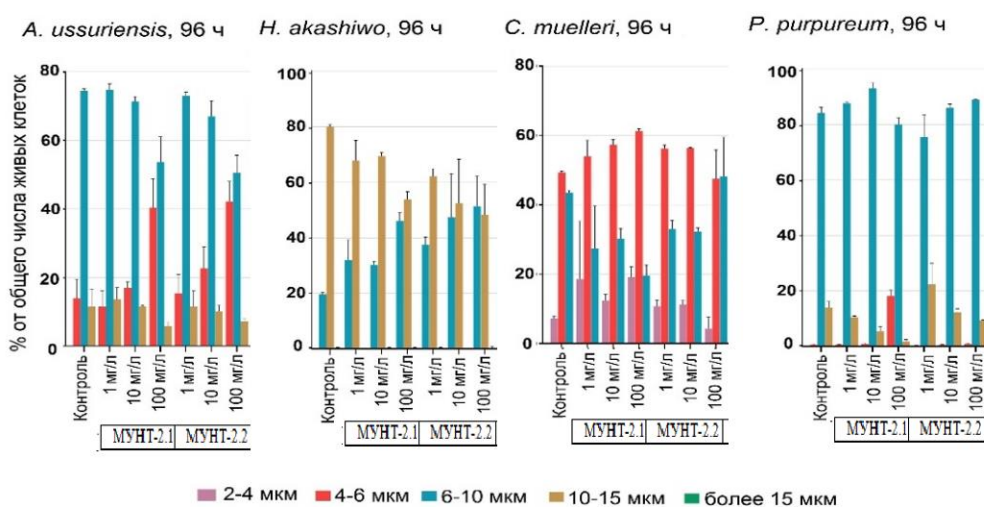


Рис. 30. Изменение размера клеток четырех видов морских микроводорослей при воздействии МУНТ (96 ч)*. * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала показаны на диаграммах)

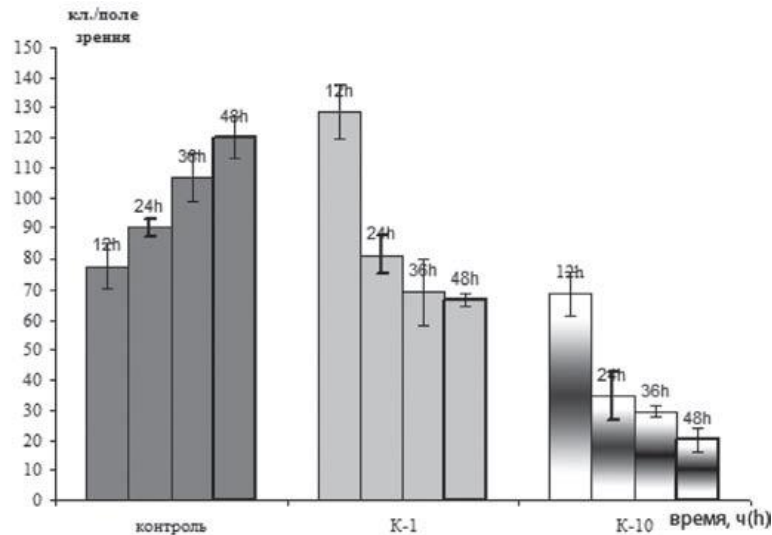


Рис. 31. Диаграмма изменения числа клеток *Pseudo-nitzschia pungens* в поле зрения в контрольной группе, при введении МУНТ-2.1 в концентрации 1 мг/мл (К-1) и 10 мг/мл (К-10)

При контакте в течение 36 и 48 ч клеток *Pseudo-nitzschia pungens* с наночастицами в концентрации 10 мг/мл в поле зрения в большом количестве попадают «пустые» клетки (рис. 32, а), длина которых, по сравнению с клетками в контрольной группе, не меняется.

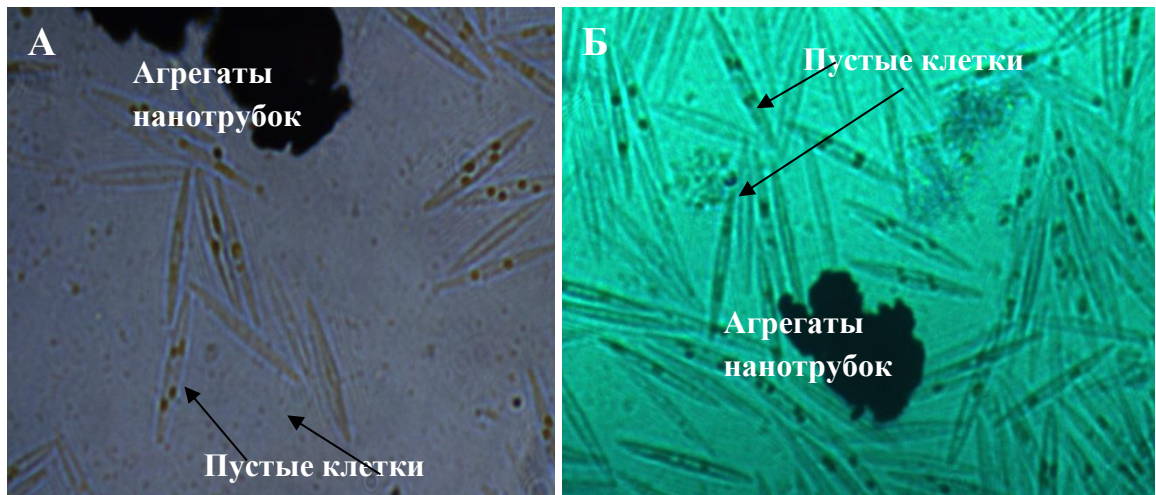


Рис. 32. Клетки *Pseudo-nitzschia pungens* в группе К-10 при инкубировании 36 ч а) «пустые» клетки и б) конгломераты нанотрубок. Видно, что нанотрубки присутствуют в виде агрегатов (черные пятна). Увеличение 630×

Также стоит отметить наличие большого количества шаровидных объектов коричневого или серого цвета (рис. 32, б), лежащих свободно либо образующих

конгломераты. При измерении размеров хлоропластов у клеток *Pseudo-nitzschia pungens* выявлено, что при контакте с наночастицами изменяются их размеры. Через 12 ч контакта клеток с нанотрубками в концентрациях 1 и 10 мг/мл размеры хлоропластов уменьшаются соответственно на $13,9 \pm 0,2$ и $22,5 \pm 0,2$ %. Через 48 ч эти показатели достигают значений $25,9 \pm 0,4$ и $27,3 \pm 0,2$ %.

Подобно диатомовым водорослям, клетки золотистой водоросли *Isochrysis galbana* (клон TISO) реагируют на присутствие в среде нанотрубок в концентрации 1 и 10 мг/мл снижением количества клеток (рис. 33).

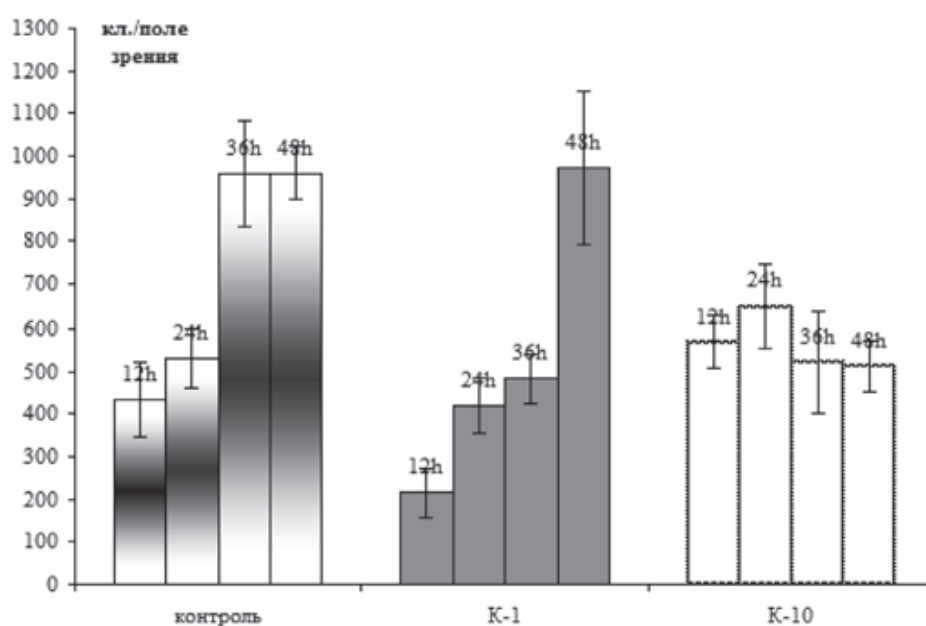


Рис. 33. Диаграмма изменения концентрации клеток *Isochrysis galbana* в поле зрения в контроле, при введении МУНТ-2.1 в концентрации 1 мг/мл (К-1) и 10 мг/мл (К-10)

При этом через 24 и 36 ч контакта с наночастицами в концентрации как 1, так и 10 мг/мл наблюдается уменьшение площади клеток *Isochrysis galbana* соответственно до $13,3 \pm 2,1$ мкм² (на $26,0 \pm 0,3$ %) и $12,9 \pm 2,3$ мкм² (на $28,2 \pm 0,3$ %). В контроле этот показатель составляет $17,9 \pm 3,0$ мкм². Одновременно наблюдается снижение концентрации клеток со жгутами, увеличивается количество шаровидных неподвижных клеток (планозиготы) и замедляется двигательная активность клеток (рис. 34).

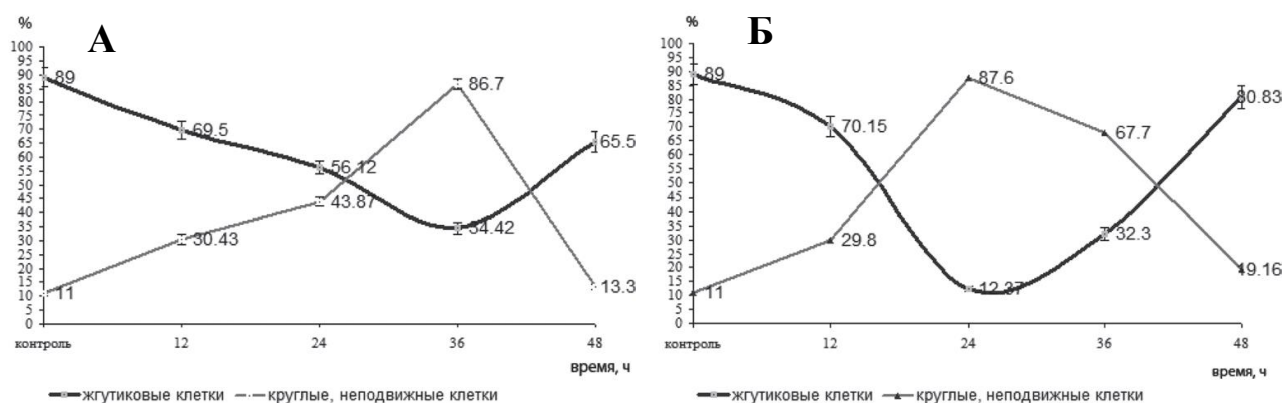


Рис. 34. Диаграмма изменения числа подвижных и неподвижных клеток *Isochrysis galbana* при введении МУНТ в концентрации 1 мг/мл (К-1) (а) и 10 мг/мл (К-10) (б)

На рис. 34 видно, что после начального снижения количества подвижных клеток *I. galbana* через 48 ч инкубирования наблюдается увеличение числа подвижных клеток. Примерно такие же диаграммы наблюдаются и при культивировании *Pseudo-nitzschia pungens*. Такое восстановление подвижности можно оценить как адаптацию клеток к нанотрубкам. В качестве интересного наблюдения стоит отметить разную реакцию на введение в среду нанотрубок в концентрации 1 мг/мл: диатомовая водоросль *P. pungens* отреагировала бурным ростом числа клеток, а золотистая водоросль *I. galbana* – резким снижением численности клеток.

Воздействие углеродных нановолокон на одноклеточные организмы

Мы исследовали влияние УНВ на организмы из группы продуцентов: типичные представители фитопланктона Японского моря (*Attheya ussuriensis*, *Heterosigma akashiwo*, *Chaetoceros muelleri*, *Porphyridium purpureum*). Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC₆ снижается на 50 % (EC₅₀) в сравнении с контролем. Величины EC₅₀, полученные на основе данных проточной цитометрии и рассчитанные в программном пакете GraphPad Prism 7.04, представлены в табл. 11–14.

Результаты теста на ингибирование роста водорослей *H. akashiwo* показали, что острая токсичность всех образцов зависела от дозы (рис. 35). Образец с боль-

шим количеством примесей Ni УНВ-1.2 проявлял большую ингибирующую активность, чем УНВ-1.1. Образец УНВ-1.1 почти не проявлял токсичности даже в концентрации 100 мг/л. Кроме того, микроводоросли, подвергшиеся воздействию этого образца, росли лучше, чем контроль в течение 7-дневного эксперимента (рис. 36). Эксперименты со всеми образцами УНВ выявили большое количество клеток неправильной формы (рис. 36, а и б).

Таблица 11

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *A. ussuriensis*

Твердые частицы	Выживаемость, EC_{50}^* (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC_{50}^* (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC_{50}^* (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
УНВ-1.1	–	> 1000	137,6 (135,0–140,2)	94,3 (91,2–97,6)	154,4 (150,3–158,7)	65,4 (62,1–68,8)	41,7 (40,2–43,2)
УНВ-1.2	–	–	170 (168,9–171,2)	–	297,8 (294,0–301,6)	70,1 (67,4–72,9)	55,5 (55,0–56,1)

* Здесь и в табл. 11–14 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

** Здесь и в табл. 11–14 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC₆, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.

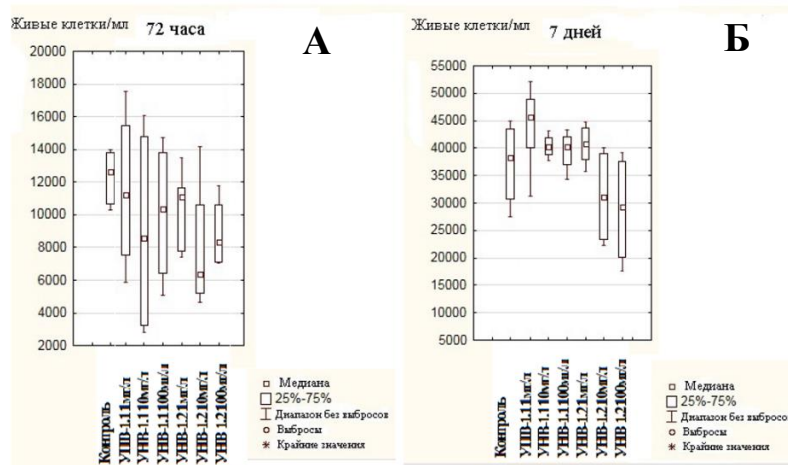


Рис. 35. Выживание морских микроводорослей *H. akashiwo* в течение 72 ч (А) и 7 дней (Б) при воздействии различных концентраций углеродных нановолокон (УНВ) при 20 °С и 12 : 12 ч светло-темный цикл

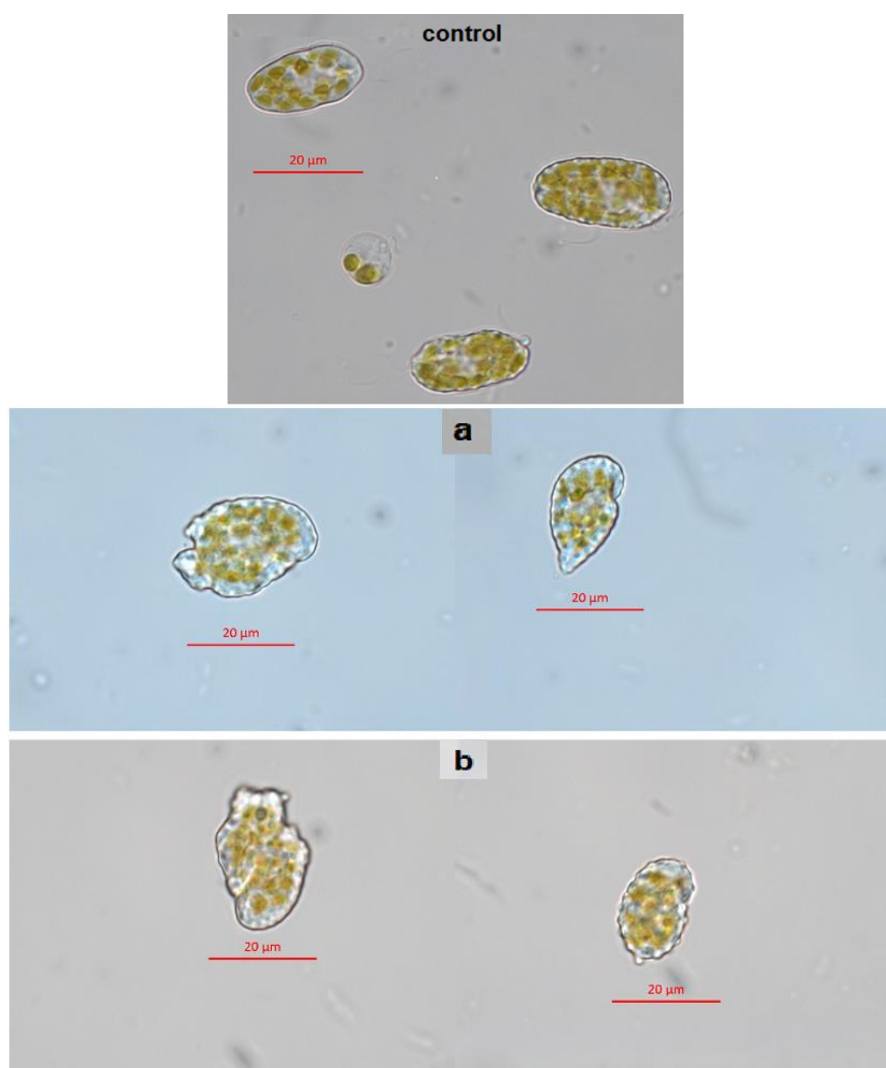


Рис. 36. Конфокальная микроскопия морских микроводорослей *H. akashiwo* при влиянии УНВ после 7 дней эксперимента при экспозиции 100 мг/л: **a** – УНВ-1.1; **b** – УНВ-1.2

Влияние 2 видов УНТ на флуоресценцию хлорофилла *a* 4 видов микроводорослей представлено на рис. 37 (за 100 % принято измерение группы контроля для каждого вида водорослей).

Таблица 12

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *H. akashiwo*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
УНВ-1.1	–	–	110,6 (107,5–113,8)	51,2 (50,3–52,0)	82,5 (82,0–83,1)	46 (44,4–47,7)	31,4 (30,5–32,2)
УНВ-1.2	–	–	135,8 (133,5–138,2)	Увеличение на 20–25 %**	168,1 (164,1–172,2)	48 (47,0–49,1)	51,9 (51,3–52,4)

Для микроводоросли *A. ussuriensis* наибольшее увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* и, соответственно, снижение интенсивности фотосинтеза вызвали образцы УНВ-1.1 и УНВ-1.2 при концентрации 100 мг/л.

Таблица 13

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
УНВ-1.1	126 (122,9–129,3)	–	~830	59,3 (58,5–60,1)	> 1000	39,83 (39,0–40,7)	33,8 (33,2–34,5)
УНВ-1.2	137,7 (133,7–141,9)	~601	~428	Увеличение на 15–18 %*	Увеличение на 10–25 %**	60,2 (59,0–61,3)	223,2 (222,5–223,9)

У *H. akashiwo*, использованные углеродные нанотрубки не вызвали достоверного изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* в используемых концентрациях. Для *C. muelleri* увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла отмечено для образцов УНВ-1.1 при концентрации 100 мг/л. Для *P. purpureum* на фотосинтез микроводоросли наиболее выраженный эффект проявили УНВ-1.1.

Таблица 14

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
УНВ-1.1	133,5 (132,9–134,1)	39,5 (38,3–40,7)	61,5 (60,2–62,8)	–	~654~	~359	увеличение на 20–35 %**
УНВ-1.2	262,1 (257,1–267,3)	106,1 (104,9–107,3)	246,4 (234,7–259,0)	–	–	~692	~479

Изменение размера клеток водорослей при воздействии исследуемых видов наночастиц представлено на рис. 38.

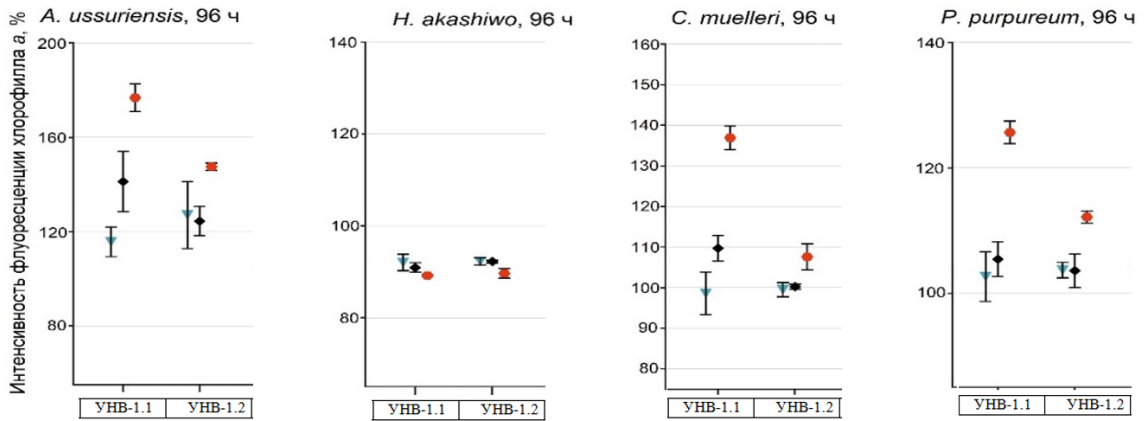


Рис. 37. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* четырех видов морских микроводорослей при воздействии исследуемых наночастиц (96 ч*). * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (символом отмечено значение медианы, границы доверительного интервала показаны на графиках)

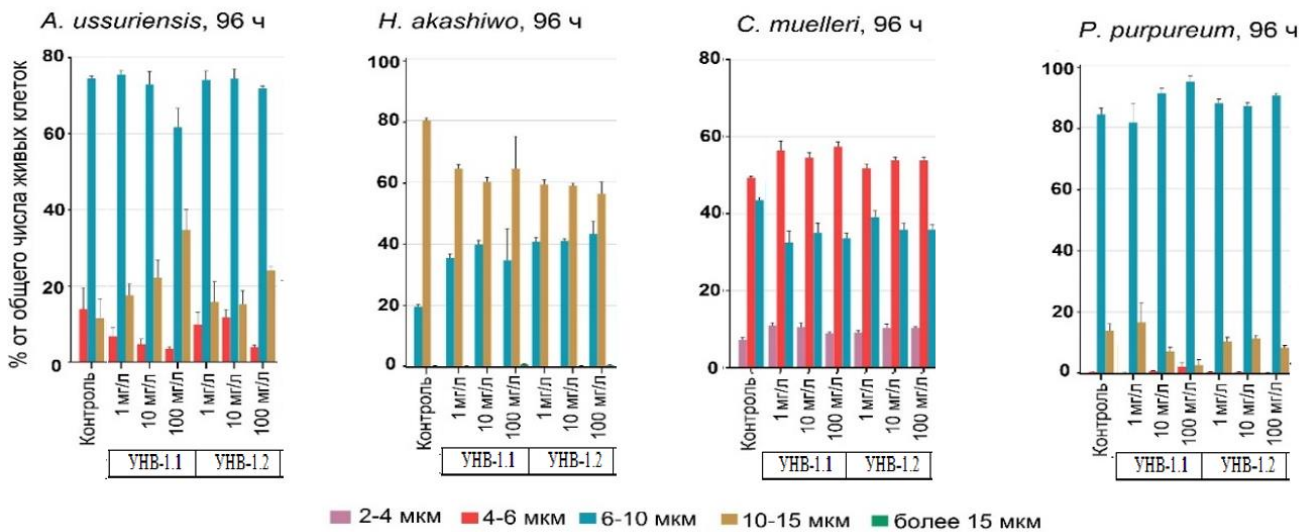


Рис. 38. Изменение размера клеток четырех видов морских микроводорослей при воздействии наночастиц (96 ч*). * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала показаны на диаграммах)

4.2. Воздействие углеродных наночастиц на беспозвоночных

Воздействие многослойных углеродных нанотрубок на беспозвоночных

Мы исследовали влияние МУНТ на разные организмы:

- иглокожие (морской еж *Scaphechinus mirabilis*);
- двустворчатых моллюсков (*Modiolus modiolus*, *Crenomytilus grayanus*, *Arca boucardi*);
- членистоногие (*Gammarus suifunensis*, *Chironomidae* (*Diamesa* sp., *Drunella cryptomeria*, *Alloperla deminuta*);

Влияние МУНТ на иглокожих

Развитие личинок морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) в эксперименте происходило сходно с контролем, достоверное отличие от контроля выявлено в только в растворах МУНТ с самыми большими концентрациями (до 100 мг/л) (рис. 39).

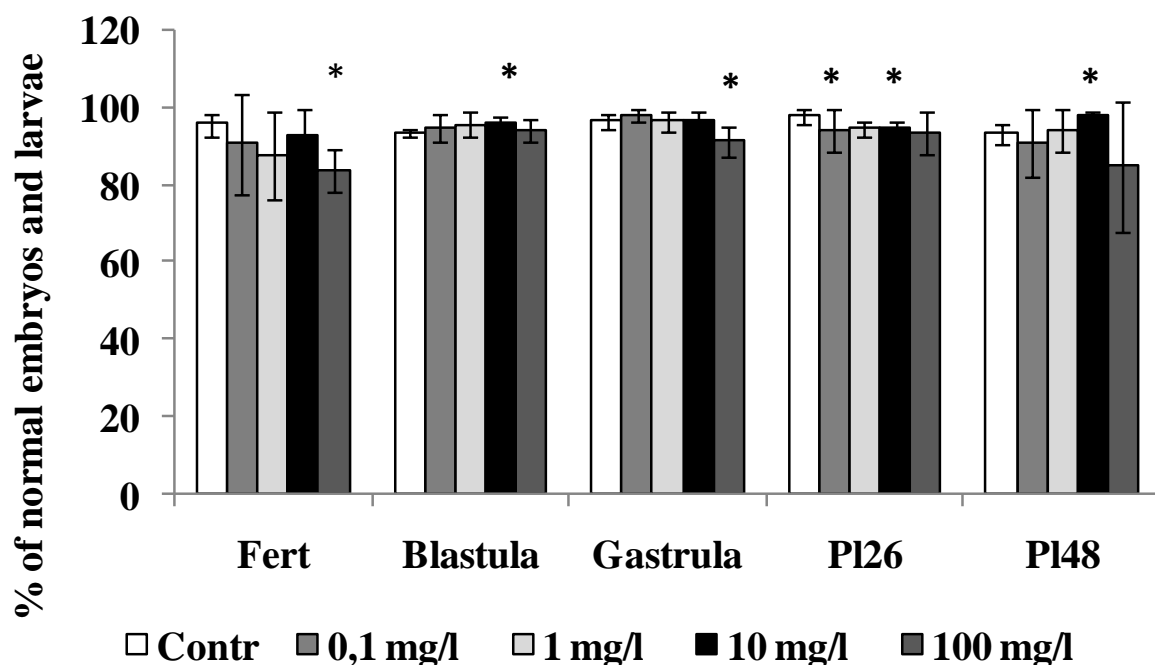


Рис. 39. Влияние МУНТ-1.1 в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0 и 100,0 мг/л нормальных эмбрионов и личинок морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) в течение 1 ч

Результаты вполне согласуются с экспериментами, проведенными на личинках хирономид, цериодафниях, микроводоросли сценедесмус и кишечной палочке (Гусев и др., 2013). Их препараты по результатам токсикологических тестов были отнесены к 3-му классу опасности, аналогично обычной саже. Для самого чувствительного тест-объекта, сценедесмуса, безвредная (подпороговая) концентрация составила 2 мг/л. Хронический эксперимент влияния МУНТ-1.1 и МУНТ-2.1 на морского ежа в тех же концентрациях показал следующие результаты (рис. 40).

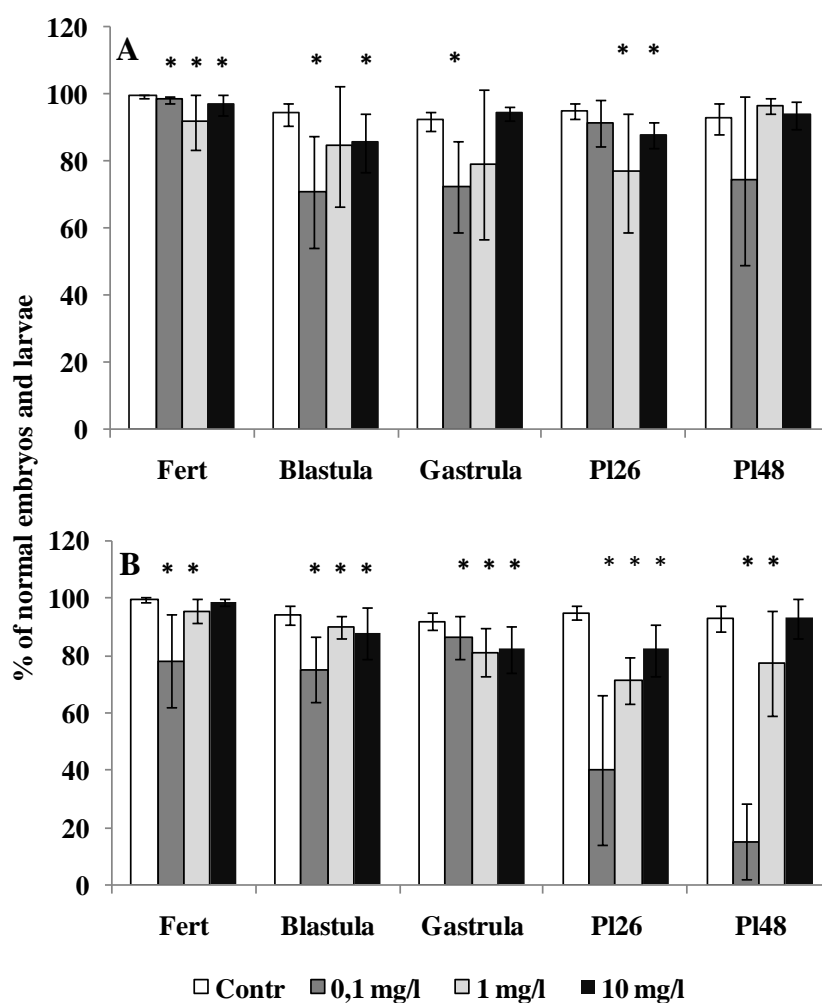


Рис. 40. Влияние МУНТ в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0 и 100,0 мг/л нормальных эмбрионов и личинок морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) в течение 5 сут: **A** – МУНТ-1.1, **B** – МУНТ-2.1

Если в остром эксперименте, когда тестируемые личинки находились в непосредственном контакте с коллоидом, содержащим нанотрубки, и могло происходить как их заглатывание (они на стадии плутеуса уже самостоятельно питаются)

или механическое воздействие на реснички, с помощью которых они плавают, то в хроническом эксперименте такого контакта не было. При этом во всех параллелях внутри гаструл прослеживалась некая темная субстанция – это могли быть или нанотрубки (которые неизвестно как туда попали) или начавшийся некроз тканей.

Взрослые ежи *Scaphechinus mirabilis* в процессе контакта с коллоидами могли их съесть (так как являются грунтоедом), но как наночастицы могли проникнуть в гонады и далее в гаметы – непонятно. Тем не менее практически на всех стадиях видно отличие от контроля, причем оно больше именно в наименьшей концентрации 0,1 мг/л (возможно, потому что частицы лучше диспергируются в воде при их небольшом содержании).

Кроме того, в хроническом эксперименте исследовалось потомство не одной, как в остром, а разных родительских пар, которые сидели 5 сут в растворах разных концентраций. Могла проявиться исходная разнокачественность биологического материала, которой в хроническом эксперименте избежать невозможно (рис. 41).

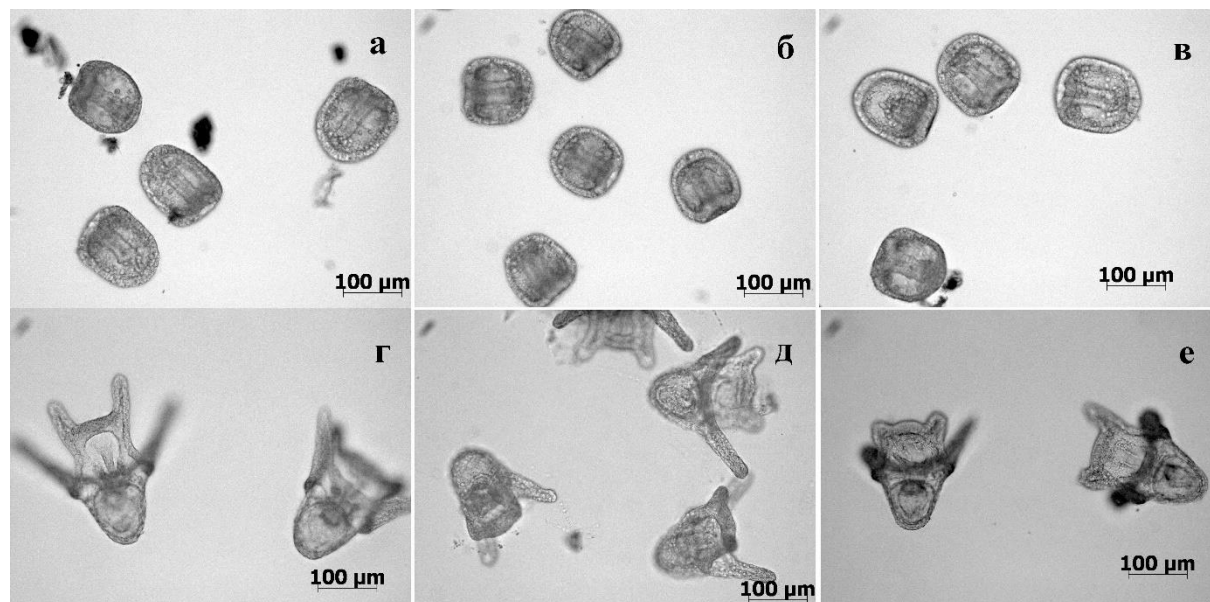


Рис. 41. Различные стадии развития личинки морского ежа при воздействии МУНТ-1.1: а, г – контроль; б, д – 1 час; в, е – 5 сут

Во всех экспериментах каких-то особых аномалий развития не было (табл. 15), наблюдалось лишь некоторое отставание, наиболее заметное на стадии гастролы (на рис. 41 – верхний ряд: в то время как личинки должны были принять

угловатую форму и иметь полностью сформированный архентерон, в опыте они были округлыми и с несформированным архентероном). У средних плутеусов основная аномалия – недоразвитие личиночных рук. Таким образом, кратковременное воздействие МУНТ не вызывало нарушение эмбрионального личиночного развития. Это позволяет отнести эти НМ к 3-му классу опасности.

Таблица 15

Количество (в %) нормально развивающихся в растворах МУНТ эмбрионов и личинок (n =8)

Концентрация МУНТ, мг/л	Стадии развития				
	Образование оболочки оплодотворения	Бластула	Гастрюла	Ранний плутеус	Средний плутеус
Контроль	95.71±2.87	93.50±1.05	96.75±1.83	98.00±1.79	93.37±2.62
0,1	90.80±12.75	95.00±3.66	98.00±1.77	94.25±5.28	91.13±8.76
1,0	87.75±11.37	95.62±3.27	96.33±2.50	94.50±1.93*	94.33±5.69
10,0	92.71±7.09	95.70±2.42*	96.75±2.31	94.87±1.73*	98.12±0.99*
100,0	83.83±5.67*	94.33±3.00	91.37±3.70*	93.55±5.37	84.83±16.68

* Отличие от контроля достоверно при P 0,05.

В другом эксперименте для оценки воздействия на развитие эмбрионов морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1864) нами были протестированы два типа многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ-2.2, МУНТ-2.3). Динамика нарушения развития и гибель яйцеклеток при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/мл показаны на (рис. 42) (табл. 16).

Таблица 16

Средние расчетные концентрации (EC₅₀) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

Образец наночастиц	Оплодотворяемость яйцеклеток, EC ₅₀ , мкг/мл*	Гибель эмбрионов, EC ₅₀ , мкг/мл				
		2 ч*	4 ч*	6 ч**	24 ч***	48 ч***
МУНТ-2.2	> 1000	255,5 (187–372)	193,2 (136–293)	163,6 (115–245)	85,5 (36– 244)	66,7 (21– 263)
МУНТ-2.3	> 1000	297,1 (152–950)	192,3 (126–325)	165,1 (109–271)	97,0 (43– 270)	75,5 (31– 218)

Примечание. В скобках приведены значения EC₅₀ с доверительной вероятностью 95 %; *p < 0,0001; **p < 0,001; ***p < 0,05.

Гибель оплодотворенных яйцеклеток увеличивалась с течением времени при воздействии всех исследуемых образцов наночастиц. Наименьшая токсичность отмечена для образцов многослойных углеродных нанотрубок МУНТ-2.2, МУНТ-2.3.

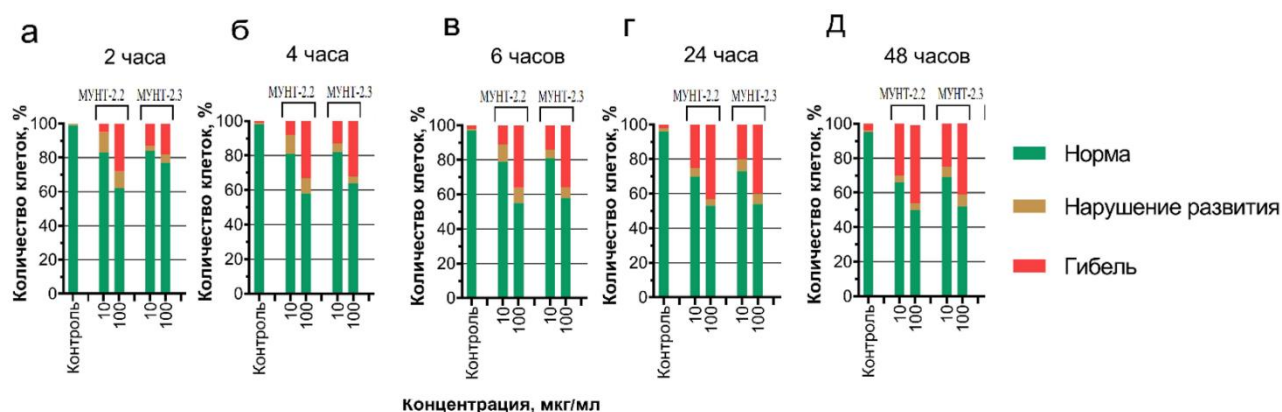


Рис. 42. Гибель и нарушение развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius* при воздействии МУНТ в концентрациях 10 и 100 мкг/л: а — 2 ч; б — 4 ч; в — 6 ч; г — 24 ч; д — 48 ч

Гистологический анализ показал наличие МУНТ-2.4 в органах пищеварительного тракта моллюсков *Modiolus modiolus*, подвергшихся воздействию углеродных нанотрубок. Свободно лежащие агрегаты диаметром от 10 до 150 мкм (рис. 43) наблюдались в просвет кишечника у всех особей ($n = 20$) обеих экспериментальных групп (1Е и 2Е). Отсутствие этих структур у контрольных животных (рис. 43, а, б) и их присутствие у всех животных, получавших нанотрубки (рис. 43, в-е), а также цвет, текстура и размер агрегатов ясно показывают, что структуры, идентифицированные в гистологических препаратах, действительно являются МУНТ-2.4.

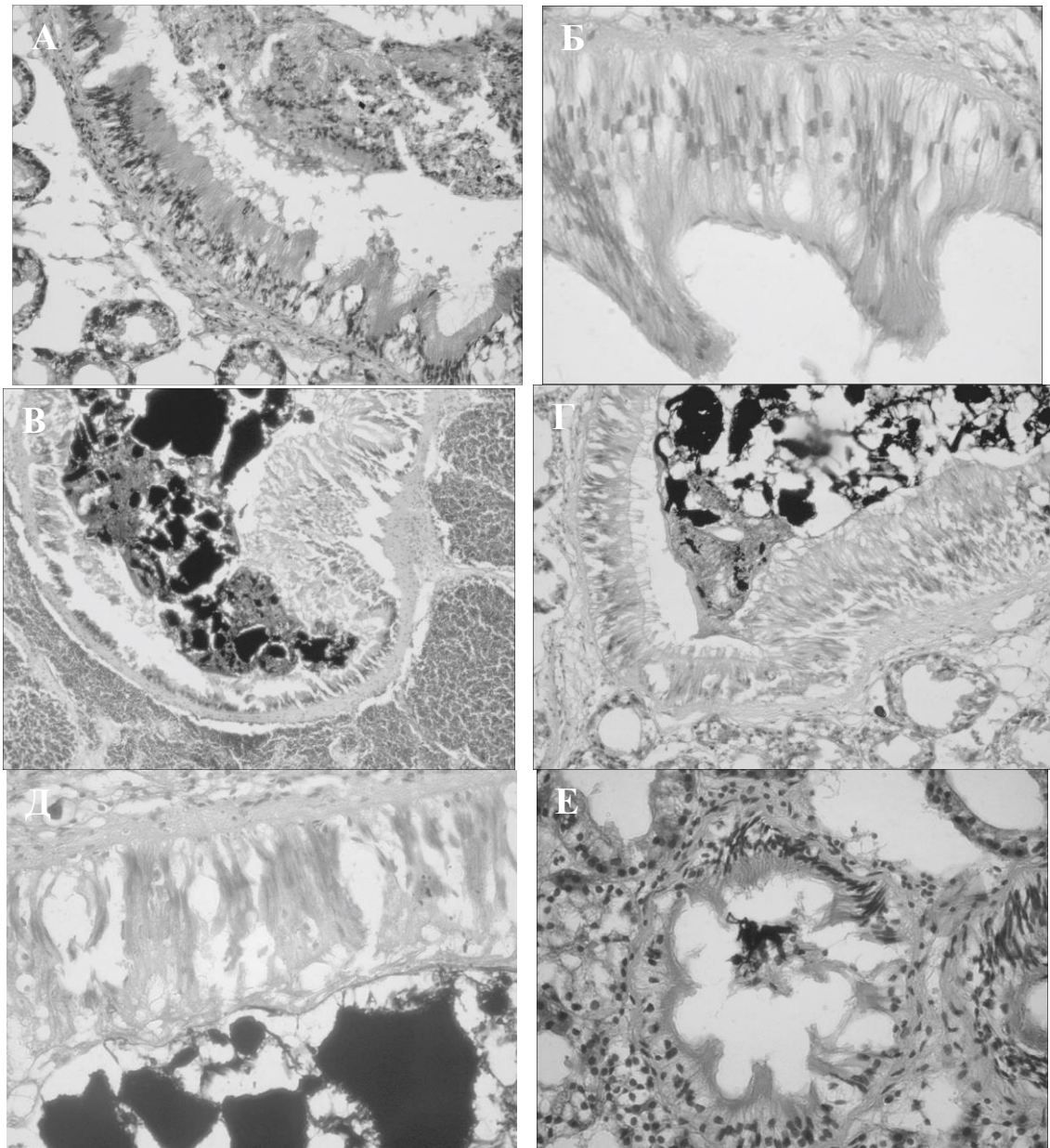


Рис. 43. Гистологическое строение кишечника и его содержимого (МУНТ-2.4) у моллюсков *Modiolus modiolus* в контрольной и опытной группах: **а, б** – контрольные группы (1С и 2С); **в** – группа 1Е и **г-е** – группа 2Е. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение: **а, в, д** – 200×; **б, г, е** – 400×

В группе 1Е агрегаты МУНТ-2.4 не проникали через эпителий, но вызывали у него эрозивные процессы и шелушение базальной мембраны, а также отечность соединительной ткани (рис. 43). Доля вакуолизированных эпителиальных клеток составила $47,5 \pm 3,8 \%$, что статистически не отличается от контроля ($36,3 \pm 3,3 \%$) при уровне значимости $p < 0,05$ (табл. 17). В группе 2Е агрегаты МУНТ-2.4 в просвете кишечника контактировали со слизью и фрагментами десквамированного эпите-

лия (рис. 43, г-е). В кишечном эпителии также наблюдались деструктивные процессы и некротические явления (рис. 43, г), а доля вакуолизированных клеток достоверно увеличилась в 1,55 раза по сравнению с контролем (табл. 17).

Иногда наблюдались небольшие темные включения, предположительно соответствующие самым маленьким агрегатам внутри эпителиальных клеток (рис. 43, е). Следует отметить, что на второй день (группа 2Е) в просвете кишечника были видны только большие агрегаты МУНТ-2.4 (рис. 43, г-е); небольшие агрегаты и свободная суспензия, которые в течение дня раньше (группа 1Е) визуализировались в кишечнике как мелкое серое вещество (рис. 43, б), наблюдались в значительно меньшей степени. В просвете кишечника животных группы 2Е наблюдали картину, демонстрирующую участие эпителиальных клеток кишечника в агрегации МУНТ-2.4 (рис. 43, е). Средние значения всех морфометрических параметров эпителиальных клеток кишечника у моллюсков из экспериментальных групп не отличались друг от друга или от контрольных значений (табл. 17).

Таблица 17

Морфометрические параметры кишечных эпителиоцитов *Modiolus modiolus*
в контрольной и экспериментальной группах

Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²	Доля вакуолизированных клеток, %
1С	5,72±0,90	4,70±0,81	19,75±6,27	12,69±2,09	10,46±1,88	84,23±22,29	36,3±3,3
1Е	8,30±2,23	5,21±0,72	30,96±7,13	21,91±6,51	9,85±2,53	131,23±41,2	47,5±3,8
2С	7,75±1,56	4,93±0,87	24,84±6,07	18,79±2,32	10,44±3,11	99,64±23,44	38,2±3,9
2е	7,13±1,19	5,03±1,07	21,23±6,68	16,31±2,31	11,26±2,15	91,42±13,87	59,4±5,7

Агрегаты МУНТ-2.4 и связанные с ними гистопатологические изменения также наблюдались в канальцах пищеварительной железы моллюсков, подвергшихся воздействию углеродных нанотрубок (рис. 44). По сравнению с контролем (рис. 44, а) у животных обеих экспериментальных групп (1Е и 2Е) были отмечены повреждения в структуре пищеварительных канальцев, а также тенденция к повышению уровня вакуолизации пищеварительных клеток (рис. 44, б), хотя различия

не считаются достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (табл. 18). Средние значения морфометрических параметров клеток пищеварительной железы моллюсков всех изученных групп достоверно не различались (табл. 18). Следует отметить, что агрегаты в пищеварительных канальцах были значительно меньше, чем в кишечнике: от 10 до 50 мкм (рис. 44, в).

Таблица 18

Морфометрические параметры клеток *Modiolus modiolus* пищеварительной железы в контрольной и экспериментальной группах

Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²	Доля вакуолизированных клеток, %
1С	8,76±2,15	5,01±1,21	23,98±6,91	15,68±3,14	9,24±2,0	78,36±21,69	54,1±4,7
1Е	5,84±0,76	4,98±0,70	21,16±4,63	13,88±2,34	10,57±1,90	88,53±16,07	71,3±7,2
2С	4,97±0,60	4,20±0,58	15,17±3,35	12,88±2,78	9,40±1,61	73,97±19,97	56,7±4,2
2е	5,3±0,66	4,27±0,56	15,77±3,05	12,23±1,62	9,57±1,19	76,23±14,02	78,2±7,3

В жабрах моллюсков, инкубированных с нанотрубками в течение 24 и 48 ч, агрегаты МУНТ-2.4 не наблюдались (рис. 45); однако в жировом эпителии животных обеих экспериментальных групп (1Е и 2Е) обнаружены эрозия и некроз (рис. 45, б). Кроме того, в группе 2Е были обнаружены картины, соответствующие морфологически апоптозу (рис. 45, в, г.). Выраженной вакуолизации клеток в эпителии жабр не наблюдалось, и средние значения морфометрических параметров клеток моллюсков всех исследованных групп достоверно не различались (табл. 19).

В целом изученные органы-мишени (жабры, кишечник и пищеварительная железа) у всех животных, взятых в эксперименте, реагировали на воздействие МУНТ-2.4 типичными гистопатологическими процессами: эрозиями и некрозами локального характера, а также тенденцией к увеличению степени вакуолизации клеток в эпителии. Никаких особых индивидуальных ответов у моллюсков внутри каждой группы не наблюдалось.

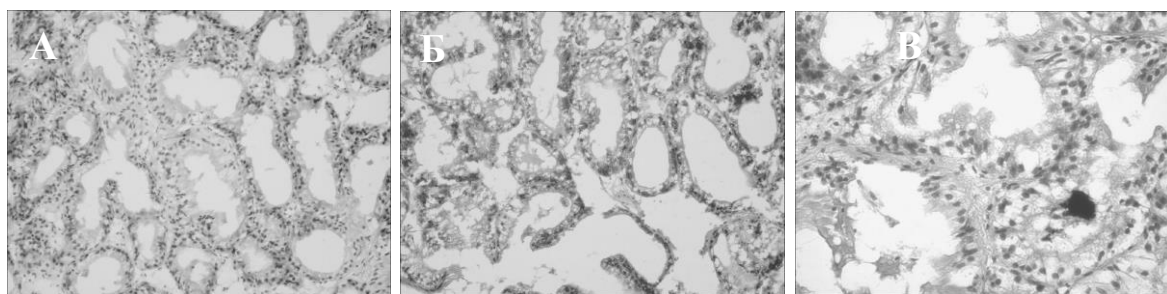


Рис. 44. Гистологическое строение пищеварительной железы и содержимого пищеварительных канальцев у моллюсков *Modiolus modiolus* в контрольной и опытной группах: **а** – общая морфология пищеварительной железы в контрольной группе (группа 1с); **б** – гистопатологические изменения в пищеварительной железе у экспериментальных животных (группа 2Е); **в** – агрегат МУНТ в просвете пищеварительных канальцев (группа 1Е). Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение: **а, б** – 100×; **в** – 400×

Таблица 19

Морфометрические параметры эпителия жаберных клеток *Modiolus modiolus*
в контрольной и экспериментальной группах

Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²
1С	7,07±2,13	5,47±0,96	25,03±6,46	12,44±1,69	10,8±1,26	86,7±16,61
1Е	5,90±0,85	4,41±0,69	18,22±3,67	10,26±0,90	8,08±0,95	57,61±8,95
2С	5,49±0,94	4,16±0,64	15,03±2,88	12,86±1,63	8,82±1,58	74,85±16,09
2е	5,28±0,79	3,74±0,74	13,39±3,55	13,37±1,36	8,02±1,96	63,94±9,33

Как было показано ранее (Anisimova, 2012), в гемолимфе моллюска *M. modiolus* существует три морфотипа клеток: гиалиноциты, полугранулоциты и гранулоциты. Эти клетки довольно четко идентифицируются с помощью проточной цитометрии (путем прямого и бокового рассеяния света) после предварительного отделения популяции гемоцитов от мусора и клеточных агрегатов, присутствующих в образцах (по идентичной высоте и соотношению площадей сигнала йодида пропидия от отдельных клеток с различной ДНК содержанием) (рис. 46). Пропорции клеток разных морфотипов в каждой группе (1С, 1Е, 2С и 2Е) варьировались в одном и том же диапазоне; Сравнение средних значений относительного количества гиалиноцитов, полугранулоцитов и гранулоцитов у животных из разных групп не

показало существенных различий (табл. 20). Кроме того, не было различий в размере (прямое рассеяние света (FSC)) и степени сложности (боковое рассеяние света (SSC)) гранулоцитов (табл. 20).

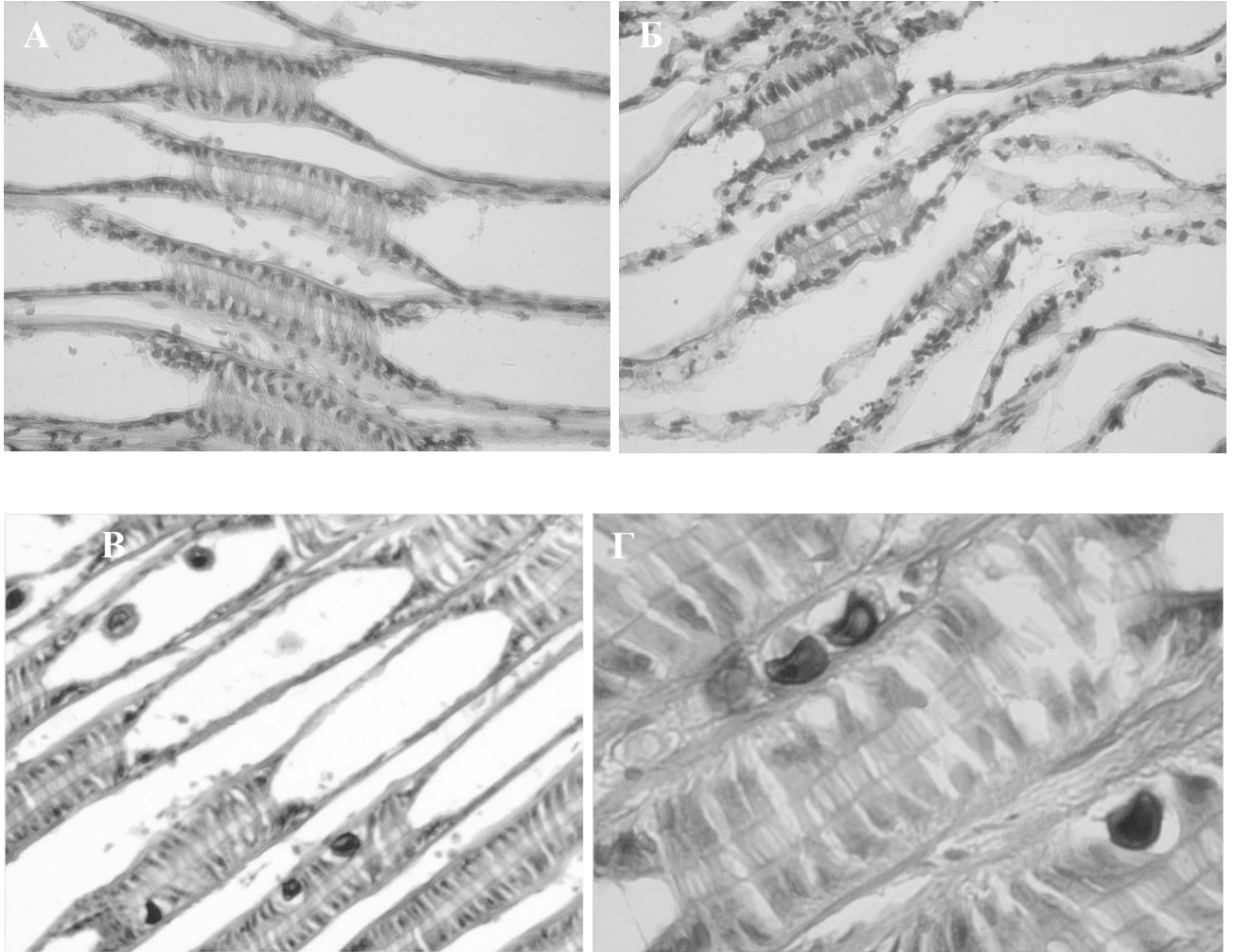


Рис. 45. Гистологическое строение жабр у моллюсков *Modiolus modiolus* в контрольной и опытной группах: **а** – контрольная (группа 1С); **б** – группа 1Е и **в**, **г** – группа 2Е. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение: **а**, **б**, **в** – 400×; **г** – 630×

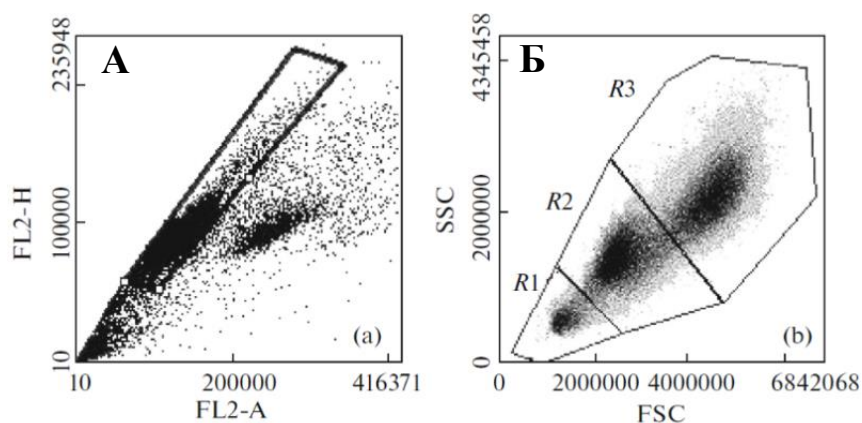


Рис. 46. Идентификация клеточной популяции гемоцитов и различных морфологических типов клеток гемолимфы *Modiolus modiolus* методом проточной цитометрии: **а** – дифференциация отдельных клеток, остатков и клеточных агрегатов в гистограмме распределения всех событий по площади (FL2-A) и высоте (FL2-H) флуоресцентного сигнала йодида пропидия; одиночные гемоциты с содержанием ДНК 2с и 4с выделены рамкой; **б** – идентификация трех морфотипов гемоцитов на гистограмме распределения одиночных клеток по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) рассеяния света (*R1* – гиалиноциты, *R2* – полугранулоцитов и *R3* – гранулоциты)

Таблица 20

Соотношение морфотипов клеток и морфологических параметров гранулоцитов в гемолимфе *Modiolus modiolus* в контрольной и опытной группах

Группа	Доля гиалиноцитов, %	Доля полугранулоцитов, %	Доля гранулоцитов, %	Размер гранулоцитов (FSC, cond. units)	Комплексность гранулоцитов (SSC, cond. units)
1С	8,6±1,6	52,47±2,5	72,2±2,5	4322,4±70,6	2455,7±78,
1Е	7,0±0,8	49,2±1,7	43,8±2,1	4329,5±64,9	2408,1±71,8
2С	11,7±3,1	45,6±2,1	42,4±2,0	4635,8±91,8	2618,7±112,1
2е	6,8±0,5	46,2±1,6	45,8±1,6	4402,5±116,4	2513,5±119,4

Воздействие углеродных нановолокон на иглокожих

Для оценки воздействия на развитие эмбрионов морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1864) нами были выбраны два типа углеродных нановолокон (УНВ-1.1, УНВ1.2). Для сравнения уровня токсичности всех исследуемых образцов наночастиц были рассчитаны концентрации ЕС50, при которых оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа снижается на 50 % и происходит гибель 50 % эмбрионов в сравнении с контролем (табл. 21). Динамика нарушения

развития и гибель яйцеклеток при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/мл показаны на рис. 47.

Таблица 21

Средние расчетные концентрации (EC_{50}) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

Образец наночастиц	Оплодотворяемость яйцеклеток, EC_{50} , мкг/мл*	Гибель эмбрионов, EC_{50} , мкг/мл				
		2 ч*	4 ч*	6 ч**	24 ч***	48 ч***
УНВ-1.1	830,4 (490–2154)	78,5 (26–323)	54,5 (20–166)	43,7 (18–109)	29,8 (11–79)	25,2 (7–82)
УНВ1.2	> 1000	93,6 (36–318)	77,5 (25–342)	48,9 (16–168)	29,1 (5–134)	24,6 (1–178)

Примечание. В скобках приведены значения EC_{50} с доверительной вероятностью 95 %; * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,05$.

При оценке влияния наночастиц на оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* отмечено, что гибель оплодотворенных яйцеклеток увеличивалась с течением времени при воздействии всех исследуемых образцов наночастиц.

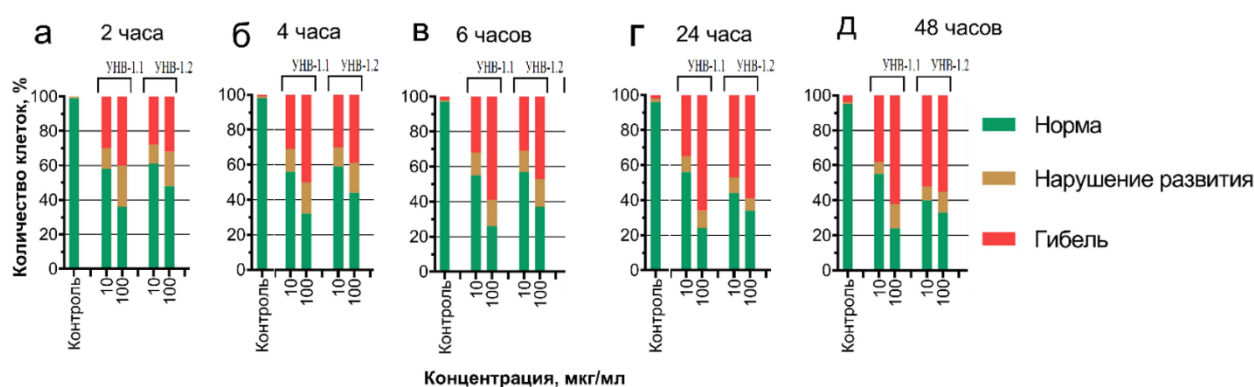


Рис. 47. Гибель и нарушение развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius* при воздействии УНВ в концентрациях 10 и 100 мкг/л: а — 2 ч; б — 4 ч; в — 6 ч; г — 24 ч; д — 48

Воздействие МУНТ на гемоциты морских моллюсков

Цитотоксичность

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия МУНТ представлены на рис. 48.

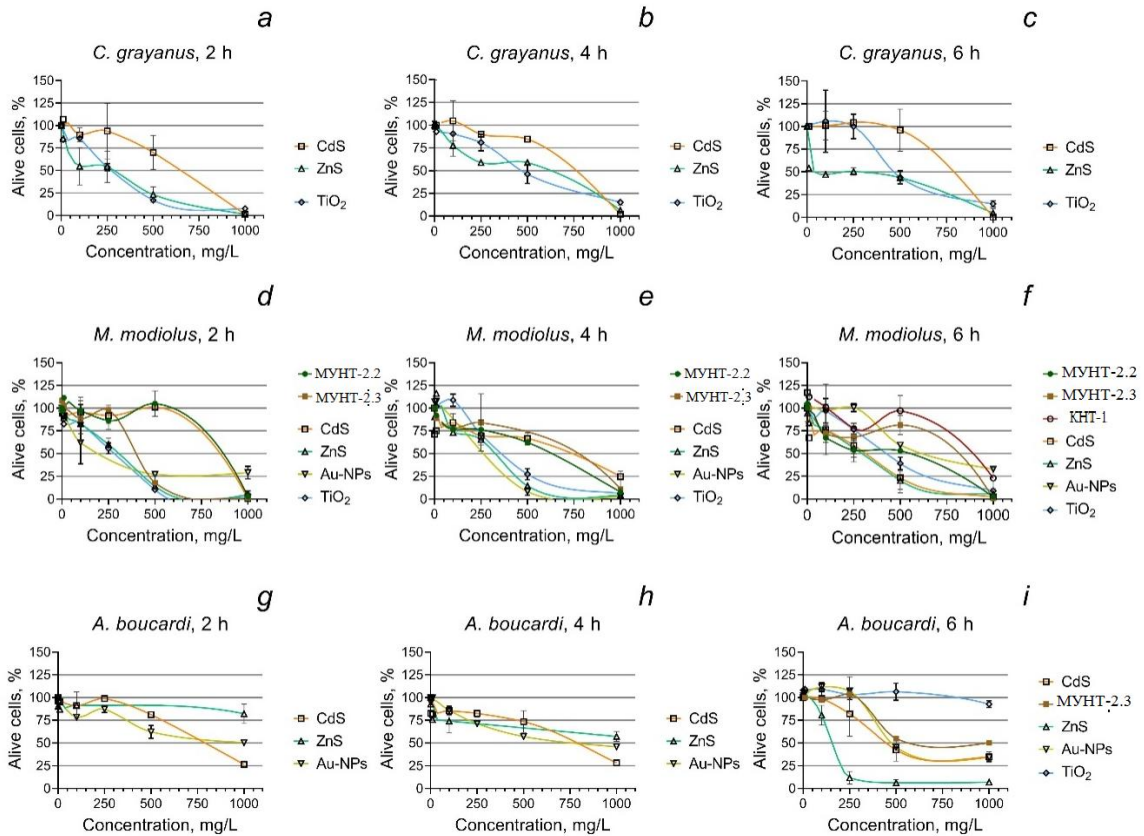


Рис. 48. Жизнеспособность клеток гемоцитов моллюсков *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* после обработки НЧ: а, б, с – изменения общего количества живых гемоцитов *C. grayanus* соответственно через 2, 4 и 6 ч воздействия на НЧ; д, е, ф – изменения общего количества живых гемоцитов *M. modiolus* после 2, 4 и 6 ч воздействия НЧ; г, h, i – изменения в общем количестве живых гемоцитов *A. boucardi* после 2, 4 и 6 ч воздействия НЧ

В целом гемоциты *M. modiolus* были наиболее чувствительны ко всем типам НЧ. Углеродные нанотрубки МУНТ-2.2 и МУНТ-2.3 продемонстрировали цитотоксический эффект для *M. modiolus* во всех трех измерениях (рис. 48, d-f). Кроме того, образец МУНТ-2.3 значительно повлиял на гемоциты *A. boucardi* после 6 ч воздействия (рис. 48, i).

Изменения мембранной поляризации

Влияние МУНТ на мембранную поляризацию гемоцитов *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* представлено в виде тепловой карты на рис. 49.

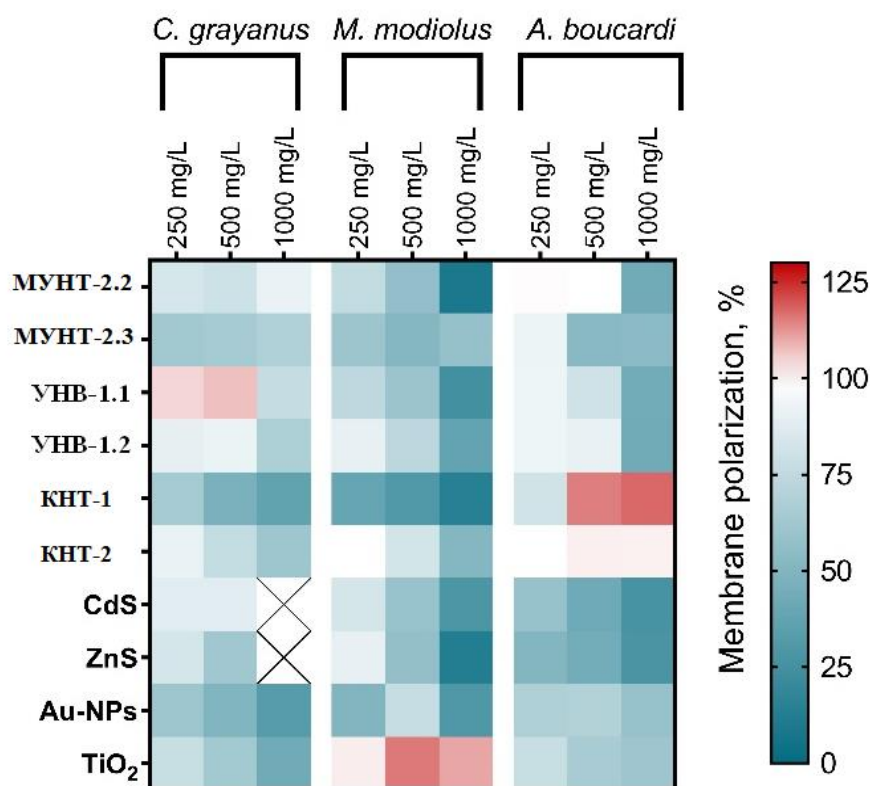


Рис. 49. Изменения мембранной поляризации *C. grayanus*, *M. modiolus* и гемоциты *A. boucardi* через 6 ч воздействия НЧ в концентрациях 250, 500 и 1000 мг/л

На рис. 49 видны изменения поляризации мембраны гемоцитов после 6 ч воздействия при самых высоких концентрациях НЧ (250, 500 и 1000 мг/л). Средняя интенсивность флуоресценции DiOC₆, прикрепленной к клеткам контрольной группы, была принята за 100 %.

МУНТ-2.2 и МУНТ-2.3 имели самое низкое влияние на поляризацию мембраны гемоцитов *A. boucardi* при концентрации 250 мг/л, но значительная поляризация была зарегистрирована при 1000 мг/л. Гемоциты *M. modiolus*, подвергшиеся воздействию МУНТ-2.2, МУНТ-2.3 в дозе 1000 мг/л, представлены на (рис. 50). Изменения клеток *A. boucardi* после 6 ч обработки МУНТ-2.3 показаны на (рис. 51).

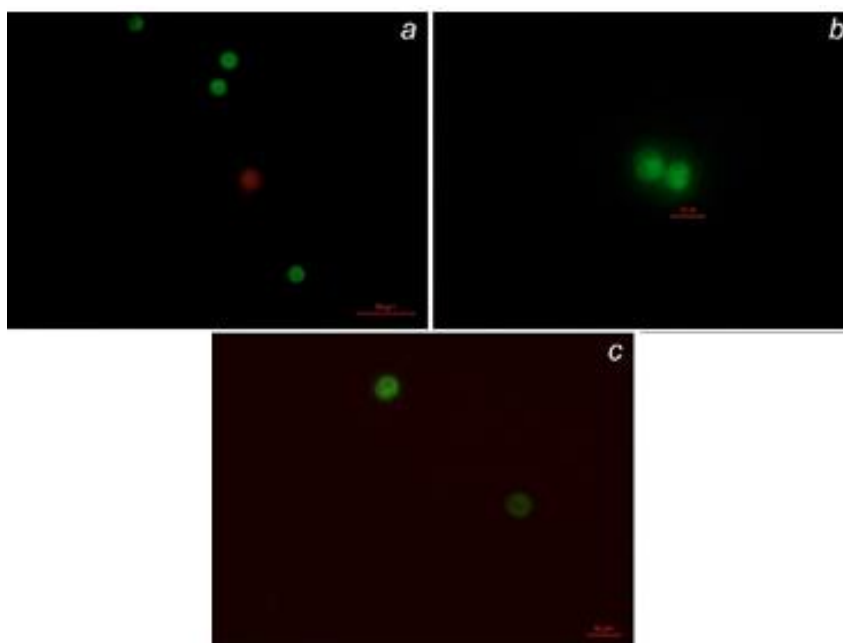


Рис. 50. Клетки гемоцитов моллюска *M. modiolus* через 6 ч воздействия НЧ в концентрации 1000 мг/л: **a** – контроль; **b** – МУНТ-2.2; **c** – МУНТ-2.3

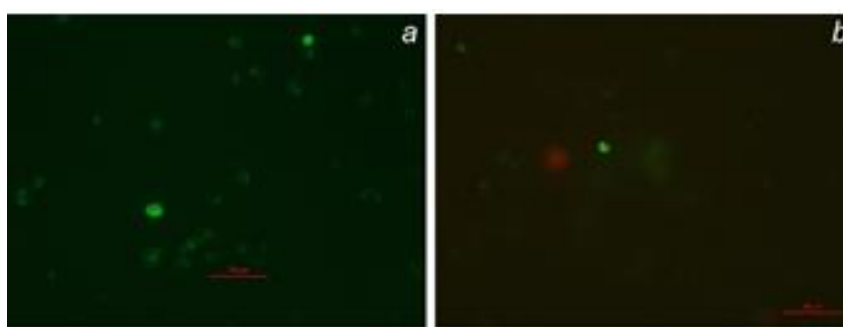


Рис. 51. Клетки гемоцитов моллюска *A. boucardi* через 6 ч воздействия с НЧ в концентрации 1000 мг/л: **a** – контроль; **b** – МУНТ-2.3

Воздействие УНВ на гемоциты морских моллюсков

Цитотоксичность

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия УНВ не наблюдалось.

Изменения мембранной поляризации

Влияние НЧ на мембранную поляризацию гемоцитов *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* представлено в виде тепловой карты (рис. 49, стр. 145).

НЧ на основе углерода (УНВ-1.1 и УНВ-1.2) имели самое низкое влияние на поляризацию мембраны гемоцитов *A. boucardi* при концентрации 250 мг/л, но значительная поляризация была зарегистрирована при 1000 мг/л.

Биотрансформация УНВ под влиянием морских ежей и моллюсков

Морские ежи *Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus* и взрослые моллюски *Crenomytilus grayanus* были выбраны для изучения биотрансформации углеродных нановолокон УНВ-1.2. Собранные конгломераты наночастиц были исследованы с помощью рамановской спектроскопии (рис 52). где полученные результаты показали, что это действительно УНВ-1.2.

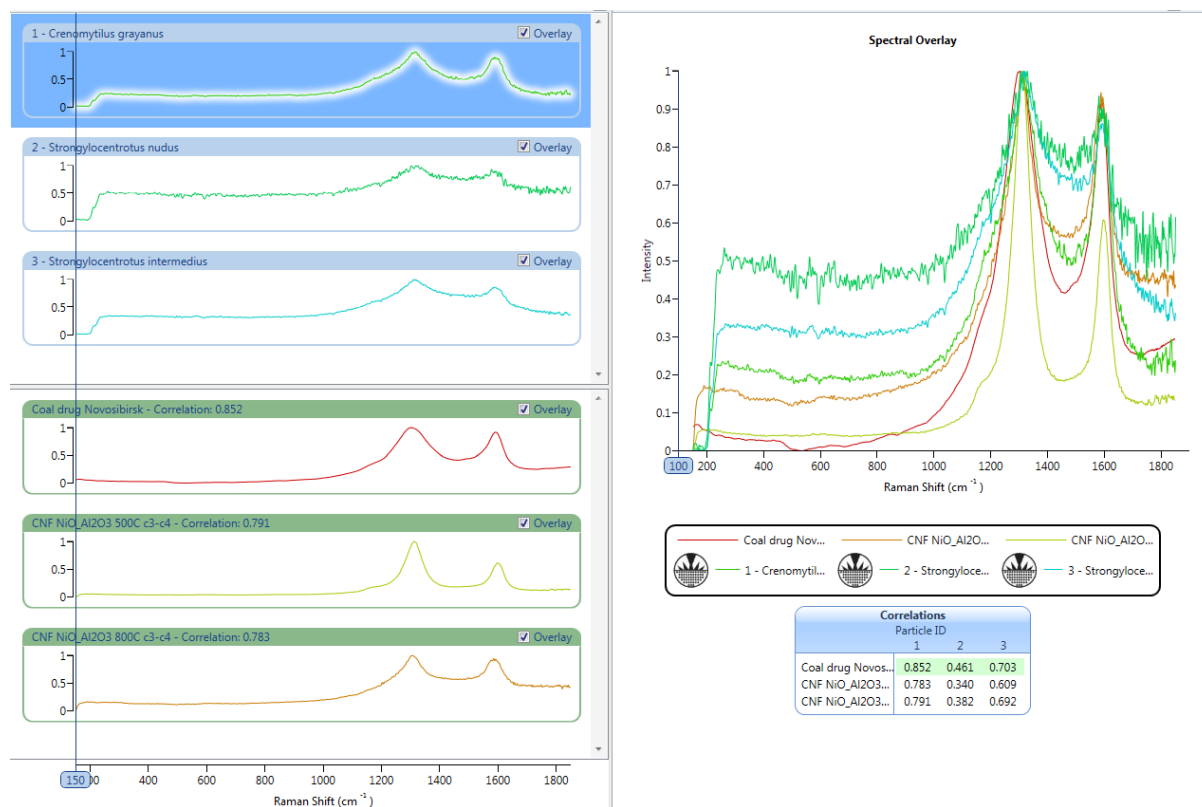


Рис. 52. Спектры комбинационного рассеяния агрегатов УНВ-1.2 после 7 дней воздействия на них *Strongylocentrotus intermedius*, *Strongylocentrotus nudus* и *Crenomytilus grayanus*

Кроме того, они показали изменение соотношения линий D (1305 см⁻¹) и G (1595 см⁻¹) в спектрах комбинационного рассеяния и уменьшение интенсивности сигналов G-связи. Измерения в спектрах рассеивания мы связываем с наличием соли на поверхности НЧ. Биотрансформационных изменений в НМ при контакте с морскими ежами *S. intermedius* и *S. nudus* и моллюсками *C. grayanus* нами обнаружено не было.

Влияние МУНТ на насекомых

Изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) следующих материалов: МУНТ 2 вида – МУНТ-2.2, МУНТ-2.3 в концентрации: 100 мг/мл. При изучении тканей пищеварительной систем *Alloperla deminuta* не выявлено видимых патологических изменений в контрольной группе. Стенки кишечника выстланы одним слоем цилиндрического эпителия в просвете кишечника имеется разнородное содержимое разных цветов (рис. 53, а), форм и размеров. В экспериментальных группах (МУНТ-2.2, МУНТ-2.3) *Alloperla deminuta* также не имела видимых повреждений и имела гистологическое строение, не отличающееся от контрольной группы. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях пищеварительной систем обнаружено не было. Кишечная стенка была точно так же выстлана одним слоем цилиндрического эпителия, как и в группе Контроль. В просвете кишечника имеется разнородное содержимое. В группах: МУНТ-2.2, МУНТ-2.3 в просвете кишечника находятся, предположительно, конгломераты наночастиц черного цвета, покрытые слизью (рис. 53, б).

Проведенная морфометрия клеток кишечного эпителия (площадь, длина, ширина, периметр) не выявила статистически значимых различий во всех экспериментальных группах. Хотя достоверных отличий нет, но на разные типы наночастиц прослеживаются отличные реакции клеток кишечного эпителия, как показано на (рис. 54). Эти данные подтверждают ранее полученные результаты о низкой чувствительности пресноводных насекомых к загрязнению наночастицами.

Обнаруженные в просвете кишечника конгломераты в группах МУНТ-2.2, МУНТ-2.3, были исследованы с помощью рамановской спектроскопии для подтверждения того, что это наночастицы (рис. 55).

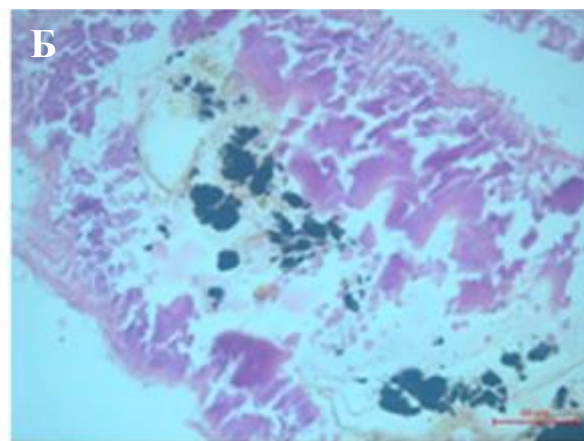
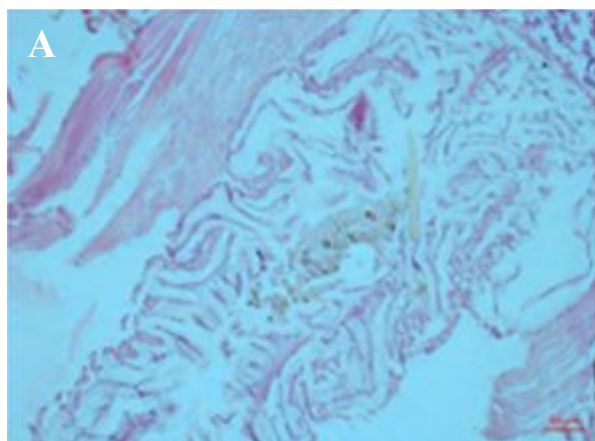


Рис. 53. Просвет кишечника *Alloperla deminuta*: а – контрольная группа. Конгломераты наночастиц в экспериментальных группах: б –МУНТ-2.2;

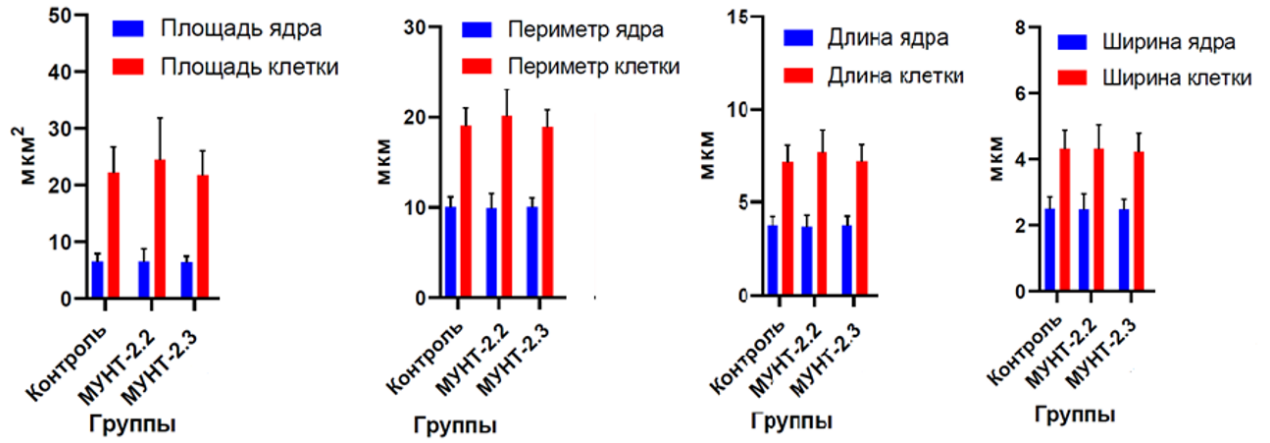
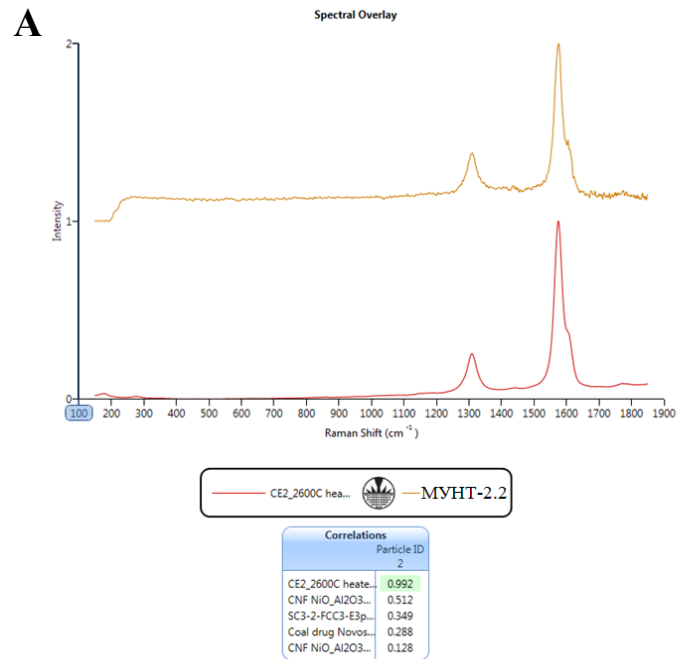


Рис. 54. Влияние МУНТ на изменения размеров ядер и клеток кишечного эпителия



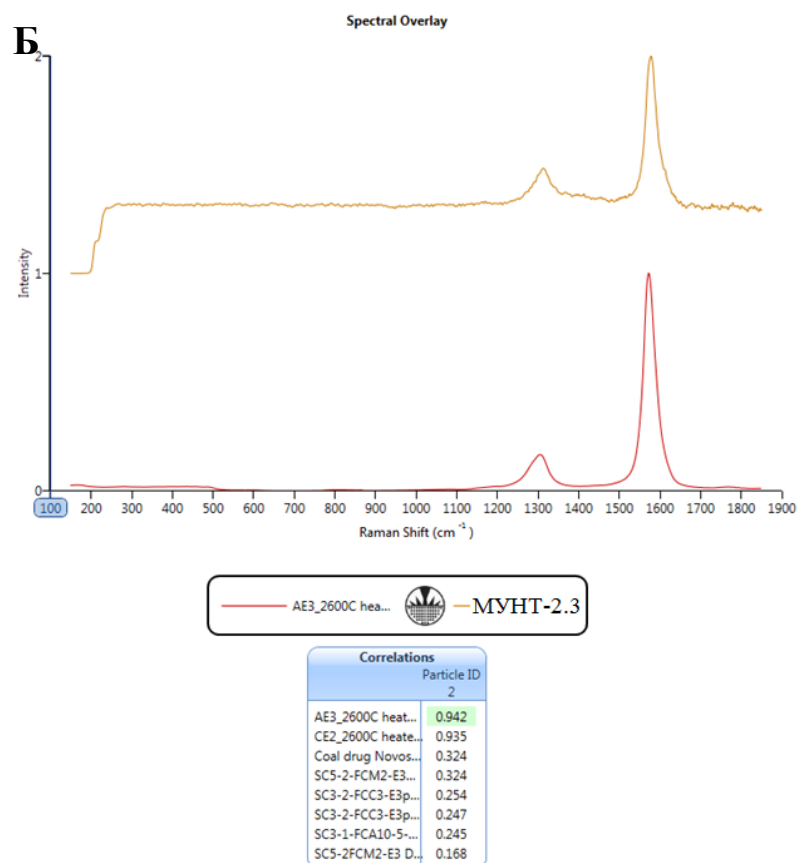


Рис. 55. Спектры комбинационного рассеяния агрегатов из кишечника в группе МУНТ-2.2 (а) спектр и в группе МУНТ-2.3 (б)

Кроме того, мы наблюдали изменение соотношения линий D (1305 см^{-1}) и G (1595 см^{-1}) в спектрах комбинационного рассеяния и уменьшение интенсивности сигналов G-связи. Было обнаружено, что эти конгломераты покрыты большим количеством слизи.

Влияние УНВ-1.2 на три вида беспозвоночных типа членистоногих

Морфологический анализ тканей дыхательной, кровеносной, нервной, выделительной и пищеварительной систем *Gammarus suiifunensis* не выявил видимых патологических изменений в группе Контроль (рис. 56). На микроскопических предметных стеклах стенки кишечника выстланы одним слоем цилиндрического эпителия (рис. 56, А), в просвете кишечника имеется разнородное содержимое разных цветов, форм и размеров. В экспериментальной группе *Gammarus suiifunensis*

также не имела видимых повреждений и имела гистологическое строение, не отличающееся от строения в контрольной группе. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях дыхательной, кровеносной, нервной, выделительной и пищеварительной систем обнаружено не было. Кишечная стенка была точно так же выстлана одним слоем цилиндрического эпителия, как и в группе контроля. В апикальной части эпителиальных клеток имелось большое количество включений (предположительно конгломератов нановолокон) (рис. 56, В).

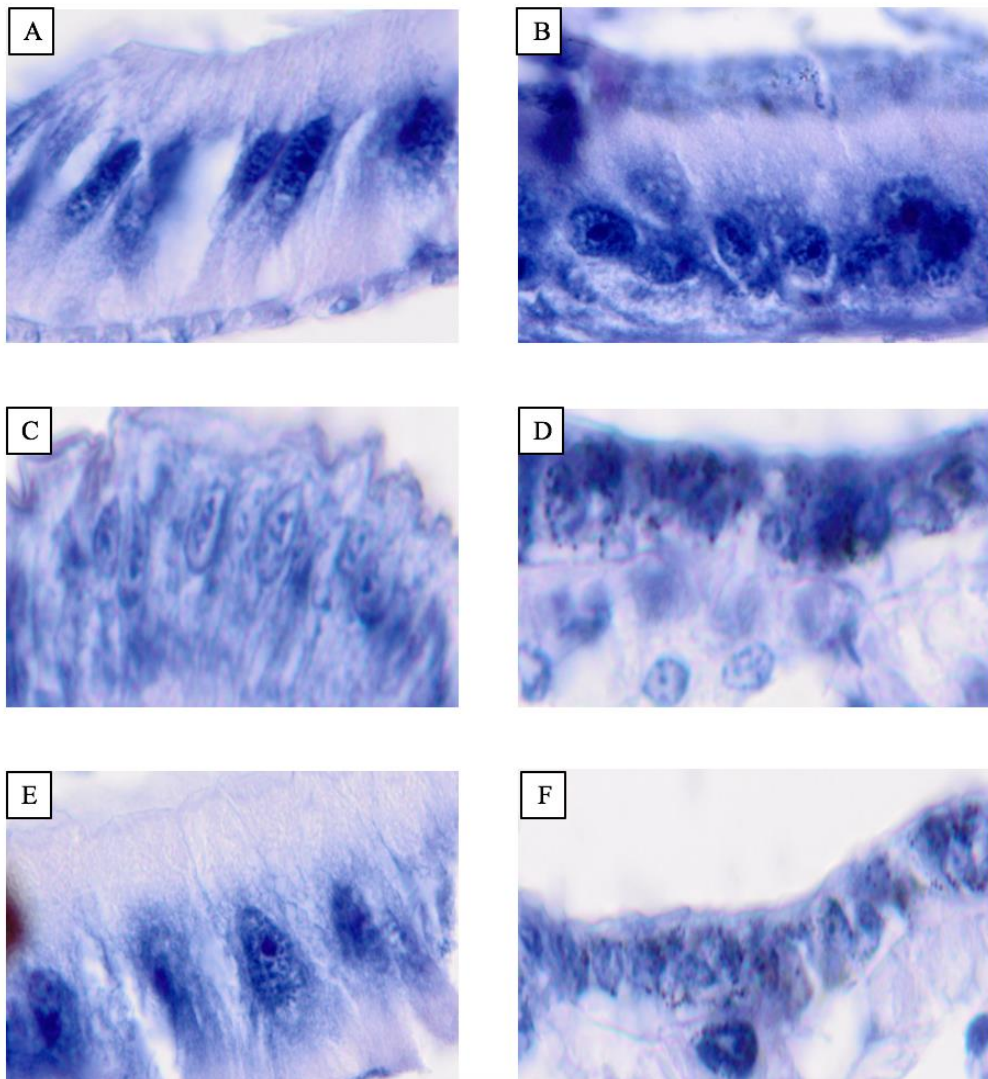


Рис. 56. Кишечный эпителий *Gammarus suifunensis* в группе Контроль (гематоксилин-эозин 400×) (А), в группе Эксперимент (гематоксилин-эозин 400×) (В); кишечный эпителий *Chironomidae (Diamesa sp.)* в группе Контроль (гематоксилин-эозин 400×) (С), в группе Эксперимент (гематоксилин-эозин 400×) (D); эпителий кишечника *Drunella cryptomeria* в группе Контроль (гематоксилин-эозин 400×) (Е), в группе Эксперимент (гематоксилин-эозин 400×) (F)

Морфологическое исследование тканей дыхательной, кровеносной, нервной, выделительной и пищеварительной систем личинок *Chironomidae* в контрольной группе не выявило видимых повреждений. Стенки кишечника выстланы одним слоем цилиндрического эпителия (рис. 56, С) в просвете кишечника обнаружено разнородное содержимое разного цвета, формы и размера. В экспериментальной группе морфологическое исследование *C. tissues* также не выявило заметных отличий от контрольной группы. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях органов дыхания, кровообращения нервной, выделительной и пищеварительной систем обнаружено не было. Внутренняя стенка была покрыта одним слоем цилиндрического эпителия. В апикальной части эпителиальных клеток наблюдалось большое количество включений (предварительно конгломератов УНВ-1.2) (рис. 56, D). Морфологический анализ тканей личинок *Drunella cryptomeria* в контрольной группе не выявил видимых повреждений. Стенка кишечника выстлана одним слоем цилиндрического эпителия (рис. 56, E).

В экспериментальной группе *D. cryptomeria* ткани также не имели повреждений и имели структуру, не отличимую от структуры в контрольной группе. Стенка кишечника была выстлана одним слоем эпителия. В апикальной части эпителиальных клеток наблюдалось большое количество включений (предположительно конгломератов УНВ-1.2) (рис. 56, F). На гистологических препаратах наблюдаются конгломераты серо-черного цвета (рис. 57, А). Обнаруженные в просвете кишечника агрегаты в экспериментальной группе были исследованы с помощью рамановской спектроскопии (рис. 58, А), полученные результаты показали, что это действительно УНВ-1.2.

Кроме того, они показали изменение соотношения линий D (1305 см^{-1}) и G (1595 см^{-1}) в спектрах комбинационного рассеяния и уменьшение интенсивности сигналов G-связи. Было обнаружено, что эти конгломераты покрыты большим количеством слизи. Кроме того, на поверхности насекомых были обнаружены аналогичные индивидуальные конгломераты (см. рис. 57, В). Конгломераты с поверхности насекомых не показали существенного изменения соотношения связей D и G

на рамановских спектрах. Никаких симптомов воспаления или некроза в стенке кишечника не было выявлено. В просвете кишечника из экспериментальной группы обнаружены конгломераты серо-черного цвета (рис. 57, С). Эти конгломераты были вновь исследованы с помощью рамановской спектроскопии (см. рис. 58, В).

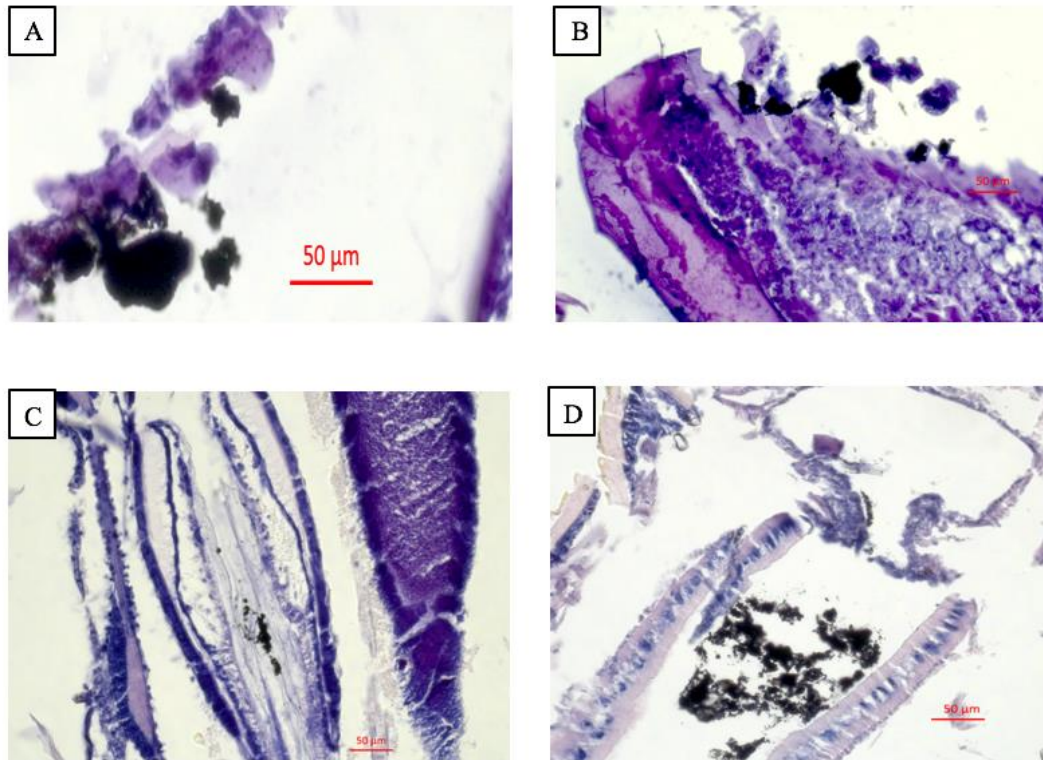


Рис. 57. Просвет кишечника *Gammarus suifuensis* в экспериментальной группе с конгломератами УНВ (гематоксилин-эозин 200×) (А); конгломераты углеродных нановолокон на поверхности лапки *Gammarus suifuensis* в экспериментальной группе (гематоксилин-эозин 200×) (В); просвет кишечника Chironomidae в экспериментальной группе с конгломератами УНВ (гематоксилин-эозин 200×) (С); кишечный просвет *Drunella cryptomeria* в экспериментальной группе с конгломератами углеродных нановолокон (гематоксилин-эозин 200×) (D)

Анализ показал, что это действительно УНВ. Отмечается, что соотношение интенсивностей связей D и G практически не изменилось, но пик, соответствующий связям D, значительно расширился, что свидетельствует о появлении большого количества дефектов в нановолокнах по сравнению с исходным. В просвете кишечника имеются конгломераты серо-черного цвета. (рис. 57, С). Кроме того, эти конгломераты были покрыты большим количеством слизи. Никаких симптомов

воспаления и некроза в стенке кишечника выявлено не было. На поверхности насекомых встречаются похожие индивидуальные конгломераты. Найденные конгломераты были исследованы с помощью рамановской спектроскопии (рис. 58, С). Существенных изменений в соотношении сигналов связей G и D не наблюдалось.

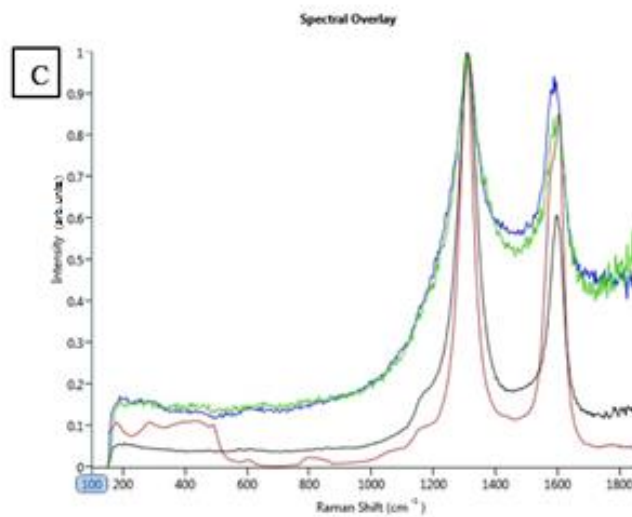
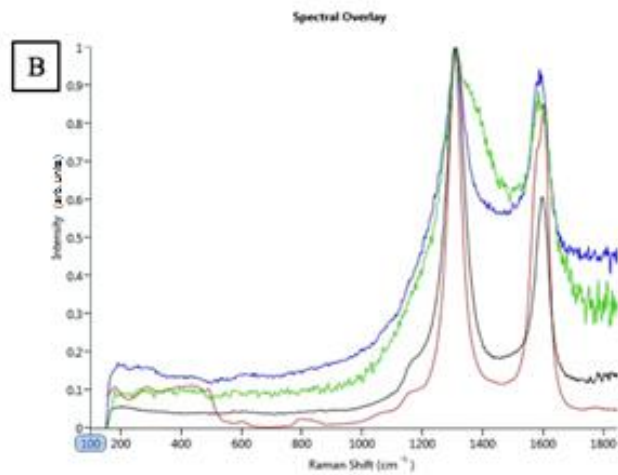
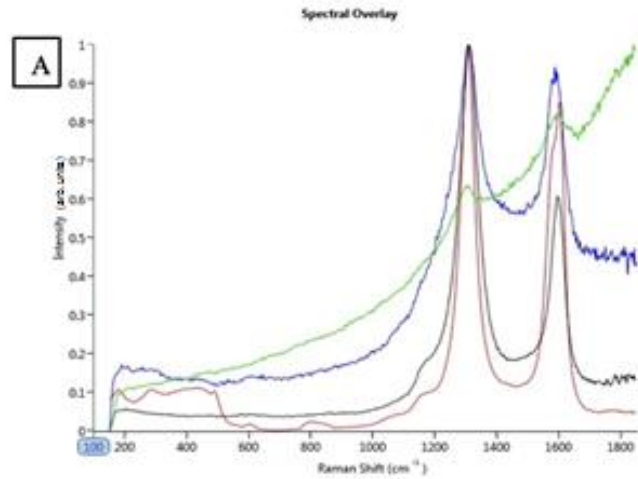


Рис. 58. Спектры комбинационного рассеяния агрегатов из кишечника *Gammarus suifunensis* в экспериментальной группе (А), спектр комбинационного рассеяния агрегатов из кишечника *Chironomidae* (*Diamesa* sp.) в экспериментальной группе (В), рамановский спектр агрегатов из кишечника *Drunella cryptomeria* в экспериментальной группе (С)

Морфометрия кишечного эпителия не выявила статистически значимых различий во всех экспериментальных группах для *G. suifunensis*, *Chironomidae* (*Diamesa* sp.) и в *Drunella cryptomeria* (рис. 59–61).

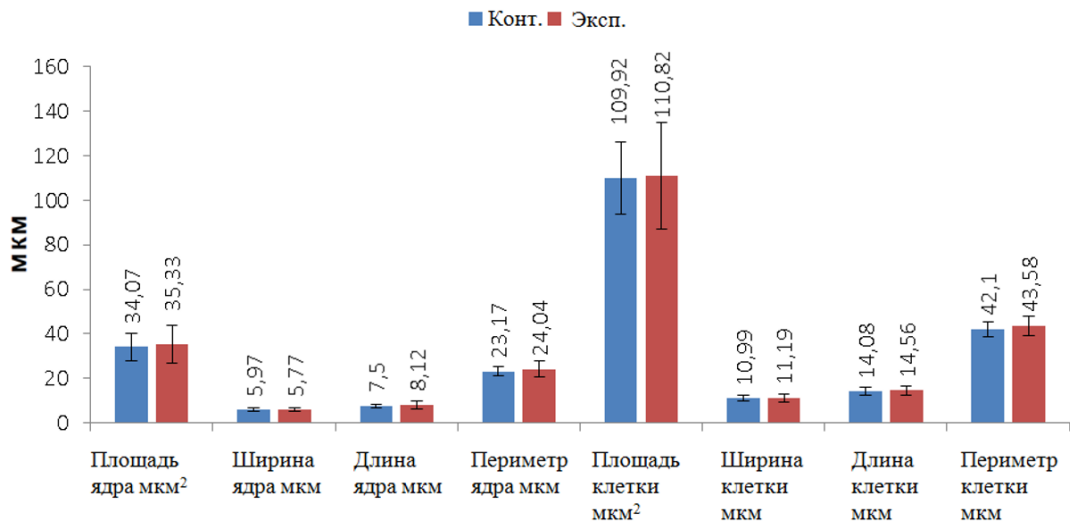


Рис. 59. Морфометрические параметры кишечного эпителия *Gammarus suifunensis*

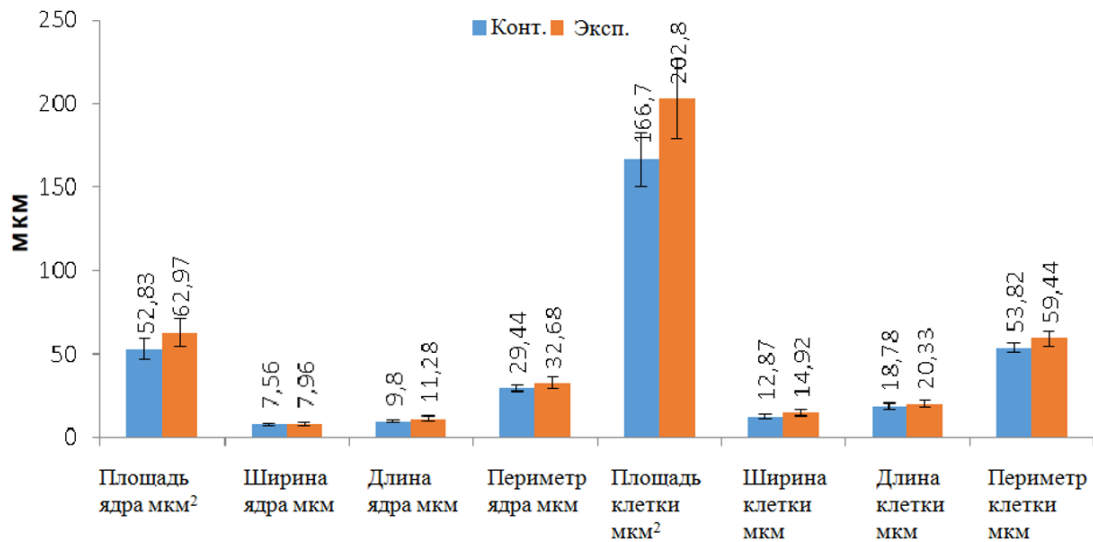


Рис. 60. Морфометрические параметры кишечного эпителия *Chironomidae* (*Diamesa* sp.)

Одиночные клетки, нагруженные темными включениями, были обнаружены в стенках кишечника экспериментальной группы (рис. 62).

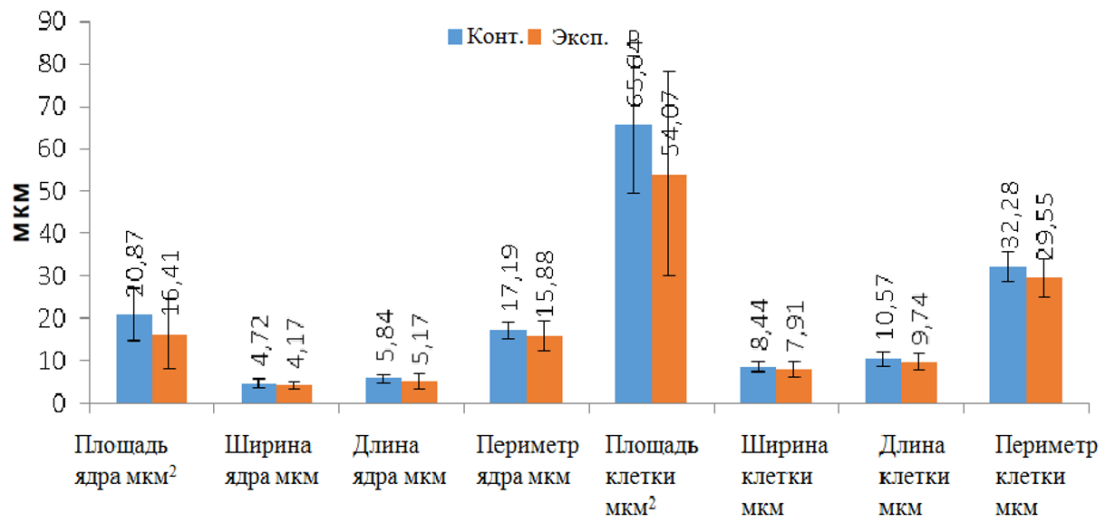


Рис. 61. Морфометрические параметры кишечного эпителия *Drunella cryptomeria*

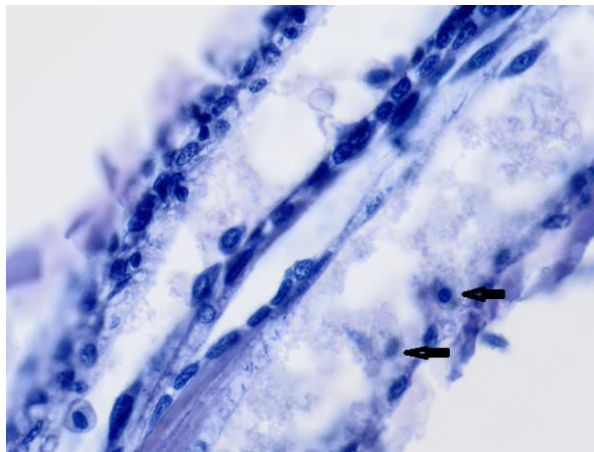


Рис. 62. Отдельные клетки нагружены темными включениями в стенке кишечника (гематоксилин-эозин 200×)

Минералы (калий, кальций, железо, магний, цинк и селен) содержатся в пресноводных насекомых. Известно, что пресноводные насекомые выделяют минералы и несколько витаминов для организмов, которые их едят. Витаминный и минеральный профили насекомых во многом зависят от состава рациона насекомых, особенно бентические водные беспозвоночные, населяющие нижние слои водоемов,

проглатывают большое количество минеральных зерен (Henry et al., 2015). В контрольной группе мы сравнили спектры содержимого кишечника с различными минералами, как показано на (рис. 63 и в табл. 22).

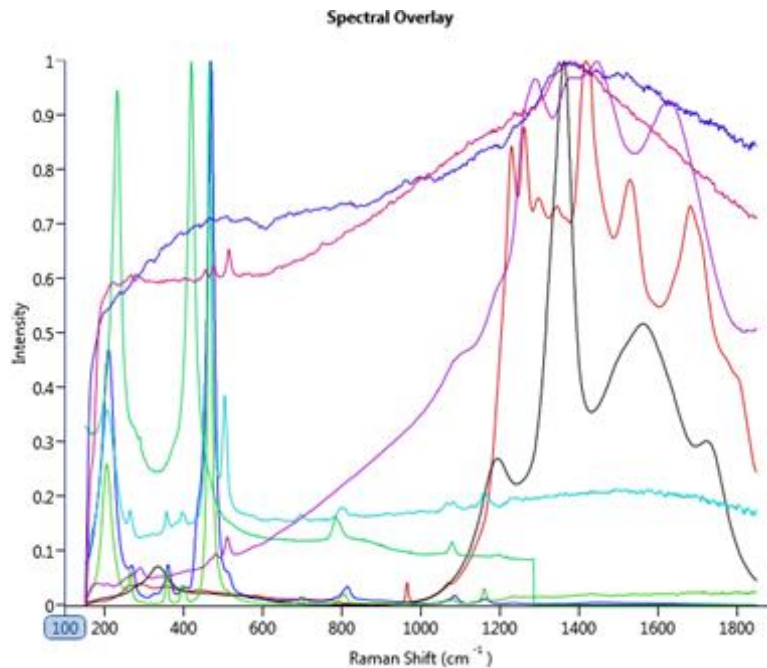


Рис. 63. Рамановский спектр агрегатов из кишечника в контрольной группе

Таблица 22

Степень соответствия спектров минералов и агрегатов из кишечника

Материалы для сравнения	Степень соответствия спектра минералов из кишечника в контрольной группе
Кварц	0.132
Фосфохедифан	0.059
Флинстон	0.143
Корнелиан	0.225
Pumice-pecutan-trachyte	0.542
Гранит	0.098
Pumice	0.444
Амазонит	0.215

В другом исследовании изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) УНВ-1.1 в концентрации: 100 мг/мл. При изучении тканей пищеварительной систем *Alloperla deminuta* не выявлено видимых патологических изменений в контрольной группе. Стенки кишечника выстланы одним слоем цилиндрического эпителия в просвете кишечника имеется разнородное содержимое

разных цветов (рис. 64, а), форм и размеров. В экспериментальной группе УНВ-1.1 *Alloperla deminuta* также не имела видимых повреждений и имела гистологическое строение, не отличающееся от контрольной группы. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях пищеварительной систем обнаружено не было. Кишечная стенка была точно так же выстлана одним слоем цилиндрического эпителия, как и в группе Контроль. В просвете кишечника имеется разнородное содержимое. В группе УНВ-1.1 в просвете кишечника находятся, предположительно, конгломераты наночастиц черного цвета, покрытые слизью (рис. 64, б).

Проведенная морфометрия клеток кишечного эпителия (площадь, длина, ширина, периметр) не выявила статистически значимых различий во всех экспериментальных группах (рис. 65). Эти данные подтверждают ранее полученные результаты о низкой чувствительности пресноводных насекомых к загрязнению наночастицами.

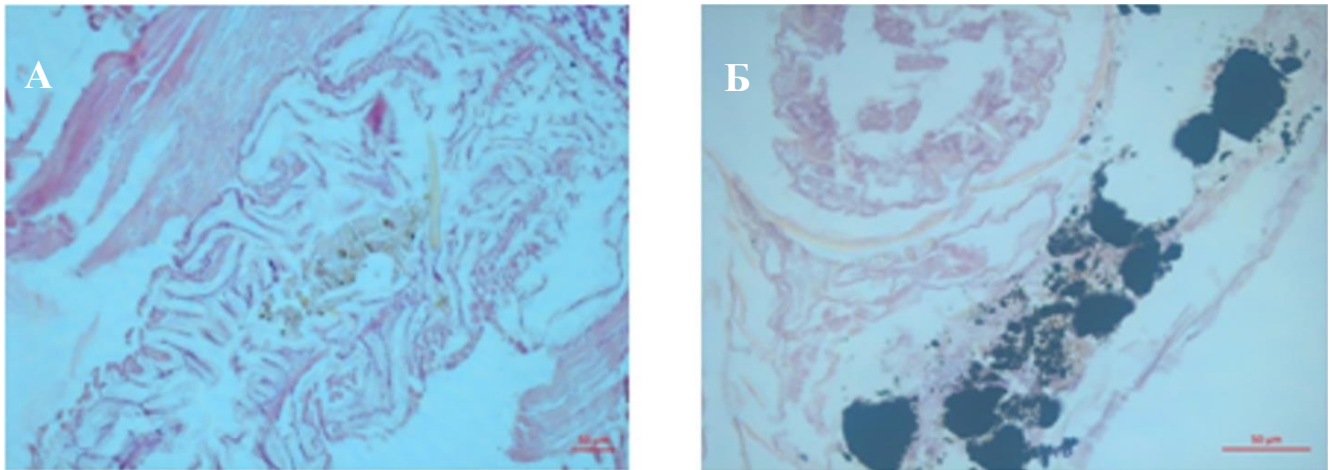


Рис. 64. Просвет кишечника *Alloperla deminuta*: А – контрольная группа. Конгломераты наночастиц в экспериментальной группе: Б –УНВ-1.1;

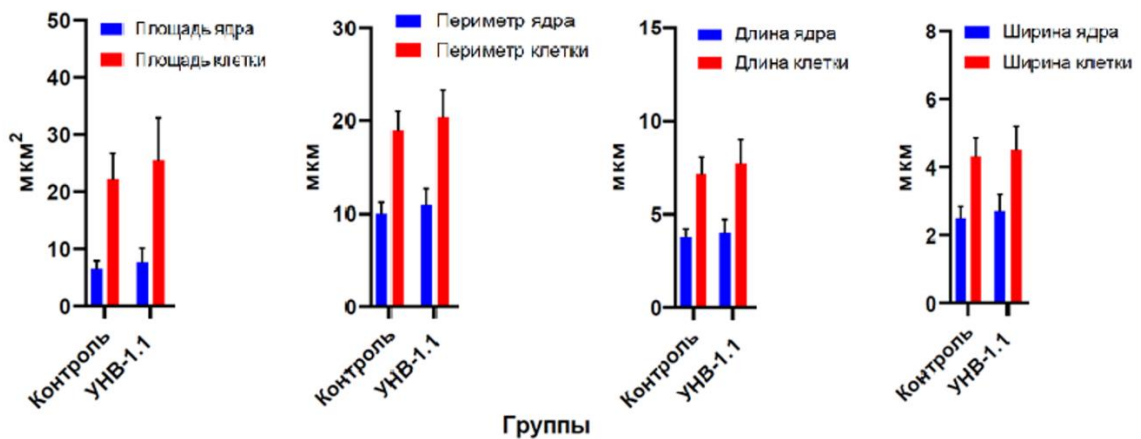


Рис. 65. Влияние наночастиц различных типов на изменения размеров ядер и клеток кишечного эпителия

4.3. Воздействие углеродных наночастиц на млекопитающих

Влияние МУНТ на выделительную систему и желудочно-кишечный тракт мышей

Патологических изменений в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта у животных в группе Контроль не обнаружено. В экспериментальной группе тучные клетки, мигрирующие в собственную пластинку, были идентифицированы после 1 дня перорального введения МУНТ-2.1. Это может привести к повышенной проницаемости соединительной ткани и развитию отека. Выявлено повышение секреторной активности и гипертрофия эпителия желез желудка.

На 2-й день МУНТ-2.1 были идентифицированы в стенке желудочно-кишечного тракта, в зоне барьера слизистой оболочки, на поверхности слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (рис. 66, а-б). Нанотрубки образовали слой с четкой границей, примыкающей к апикальной поверхности эпителиоцитов (рис. 66, в-д). Обнаружены нанотрубки и их скопления (круглые и овальные) размером до 10–20 мкм.

На 3-й день МУНТ-2.1 были обнаружены в глубоких слоях и не только в цитоплазме эпителиоцитов, но и в ядрах. Это сопровождалось сокращением базофилии ядра. В дни 3–6-й эпителиоциты слизистой оболочки различных желудочно-кишечных компартментов содержали нанотрубки, диффузно рассеянные в цитоплазме. Нанотрубки были также идентифицированы в ядрах эпителиоцитов (рис. 67, а-г).

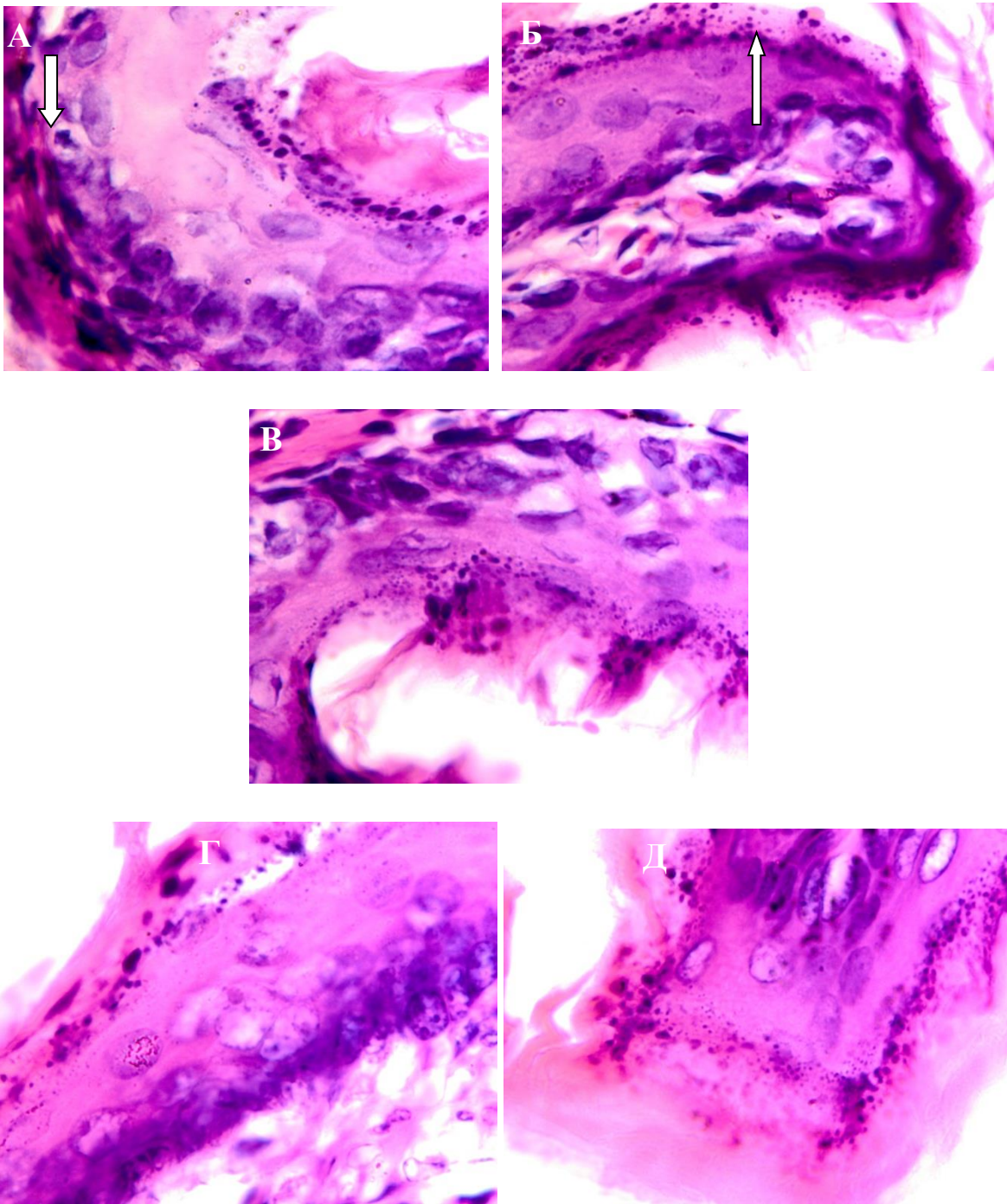


Рис. 66. Срезы слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у экспериментальных мышей, 2-й день эксперимента: **а** – желудочная стенка (стрелка: тучная клетка); **б** – поверхность слизистой двенадцатиперстной кишки (стрелка: нанотрубки в апикальной части эпителиоцитов); **в** – поверхность слизистой оболочки тонкого кишечника; **г, д** – поверхность толстой кишки слизистой оболочки. Окрашивание матоксилином и эозином, 800×.

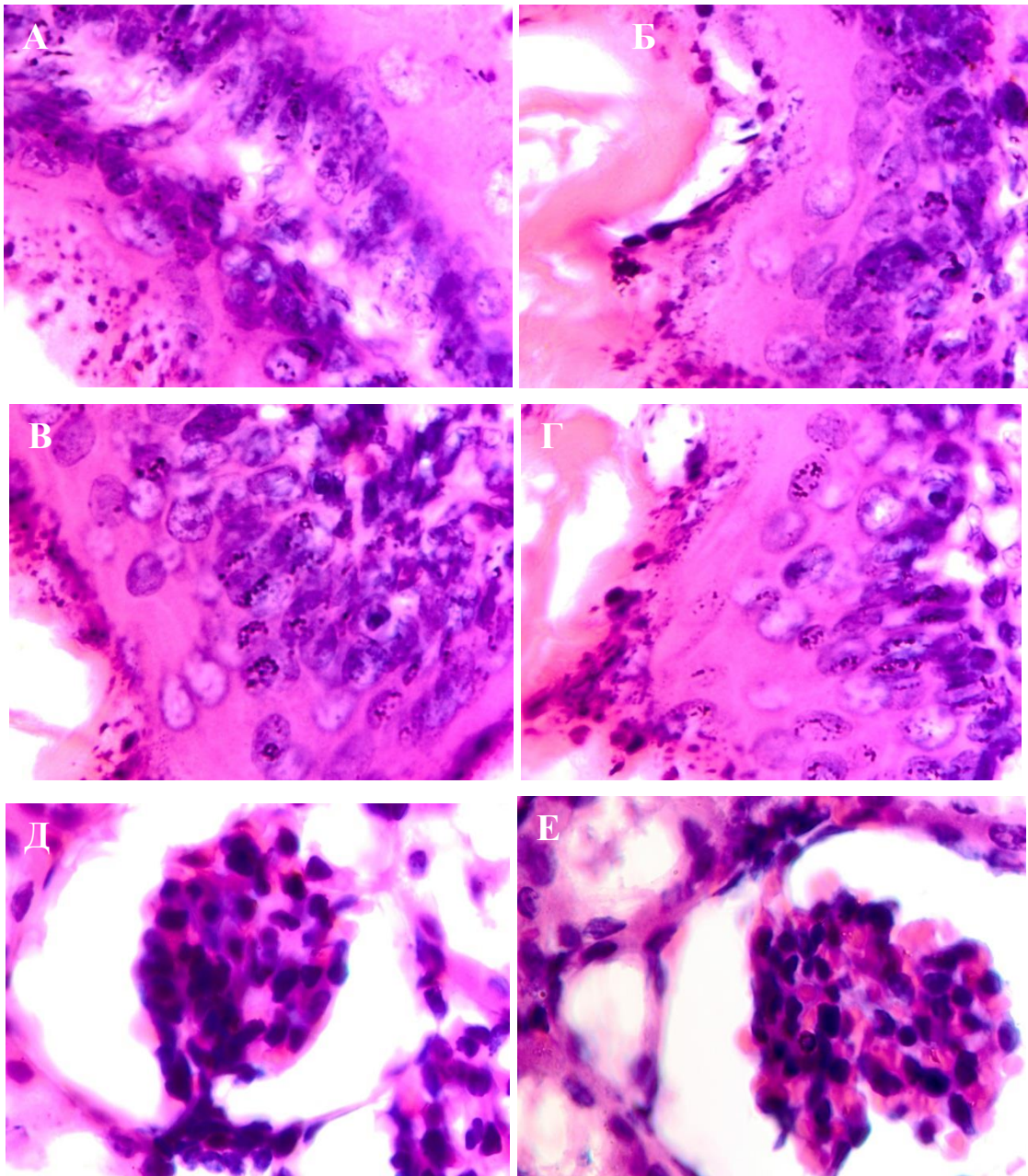


Рис. 67. Срезы слизистой желудочно-кишечного тракта у экспериментальных мышей: **а** – стенка пищевода (день 4-й); **б** – стенка желудка, пилорическая часть; **в** – двенадцатиперстная кишка (день 5-й); **г** – тонкая кишка (6-й день); **д, е** – почечные органы (дни соответственно 3 и 6-й). Окрашивание гематоксилином и эозином, 800×. MD: клетки желтого пятна

Микроциркуляторное русло желудочно-кишечного тракта слизистой оболочки собственной пластинки не изменилось у контрольных и опытных мышей. У интактных мышей не было обнаружено патологических изменений в реакции почек или барьерной фильтрации на нанотрубки после 1 и 2 дней заражения, но через 3 дня анализ образцов биопсии показал со стороны почек гиперемию сосудистых

клубочков, у Боумена-Шумлянского просвета капсула осталась неизменной. В сосудистых клубочках базофильная инфильтрация (рис. 67, д, е).

Трубчатая стенка в почечной кортикальной паренхиме имела нормальную структуру на 3-й день, но начиная с 4-го дня ядерная и цитоплазматическая базофилия увеличилась, что может указывать на напряженную функцию системы фильтрации. Ядра приобрели плоскую форму и к 6-му дню стали овальными; ядерно-цитоплазматическая пропорция значительно увеличилась. Инфляция эритроцитами развивалась в областях, прилегающих к канальцам.

Лимфоидная ткань была замечена в почечной паренхиме и соединительной ткани; фолликулы формировались, с реактивными зонами, идентифицированными в некоторых из них. Единичные нейтрофилы были идентифицированы среди лимфоцитов в лимфоидная ткань. На 6-й день в дополнение к изменениям в барьерных структурах слизистой желудочно-кишечного тракта были увеличены лимфоидные фолликулы в собственной пластинке слизистой оболочки.

В селезенке соотношение красной и белой пульпы у экспериментальных мышей сместилось в сторону преобладания белой пульпы, при этом мальпигиевы тела увеличивались в размерах после 6 дней наблюдения. В первый день эксперимента нанотрубки были идентифицированы на уровне барьера слизистой оболочки стенки пищевода в области сердца, дна и антрального отдела желудка. На 2 и 3-й дни наночастицы проникали через слизистую оболочку и эпителиальные барьеры в двенадцатиперстную кишку и стенки тонкой и толстой кишки.

Стадия 2 прохождения нанотрубок через эпителиальный барьер представляла собой эпителиальную цитоплазму. Сначала нанотрубки занимали пограничную зону в эпителиальной апикальной части, а затем достигли базальной мембраны, где образовали линию, параллельную базальной мембране. Скорость миграции нанотрубок, вводимых перорально через эпителий слизистой оболочки кишечника, была выше, чем через эпителиоциты слизистой оболочки желудка. В условиях кратковременного эксперимента не наблюдалось распознавание рецепторов, было

обнаружено только загрязнение наночастицами в эпителиоцитах. Это сопровождалось секреторной гиперактивностью железистого эпителия, защитной реакцией слизистой оболочки.

Идентификация тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки тонкого кишечника может быть результатом реакции на оральные нанотрубки. Гистофизиология тучных клеток позволяет предположить, что они участвуют в привлечении макрофагов (посредством выработки соответствующих цитокинов) и индуцируют (секретируя местные регуляторы гомеостаза) изменения проницаемости просвета микроциркуляторного русла для элиминации наночастиц через систему портальных вен в печень для детоксикации.

Нанотрубок в почечных структурах не выявлено. Клеточная реакция в макулярной полости дистальной трубчатой стенки, проявляющаяся более интенсивной базофилией и гипертрофией, была косвенным свидетельством их влияния на водно-солевой обмен у мышей.

Генерализованная реакция иммунной системы на пероральное введение нанотрубок осуществлялась за счет гипертрофии лимфоидных структур в собственной пластинке слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, гипертрофии фолликулов в почечной капсуле и паренхиме, а также гипертрофия тела Мальпиги в белой пульпе селезенки. Мы предположили, что гипертрофия лимфоидной ткани в желудочно-кишечной стенке и селезенке является результатом индукции иммунного ответа эпителиоцитами, загрязненными углеродными нанотрубками, с последующей презентацией антигена эффекторными иммунными клетками и миграция эффекторных иммунных клеток. В целом можно говорить об отсутствии выраженного токсического эффекта многостенных углеродных нанотрубок на мышцах СВА в условиях кратковременного эксперимента. Однако заслуживают внимания определенная иммуногенная активность наноматериала и повышение миграционной активности клеток, проявляющееся лимфоидной инфильтрацией.

Влияние МУНТ на показатели высшей активности нервной системы у крыс
Тест в открытом поле

В тесте «открытое поле» было зафиксировано снижение исследовательской активности у обработанных крыс и усиление стресса. В табл. 23 приведены результаты теста в открытом поле для исследования ориентации. Анализ компонентов деятельности по исследованию ориентации выявил, что в группе МУНТ-1.1 общее время двигательной активности было уменьшено в день 3 на 45 % по сравнению с измерением в день 1, а к 10-му дню снижение достигло 79 % ($p < 0,01$). Изменяющаяся динамика пересечения внутренних квадратов в группе МУНТ-1.1 была очевидна на 10-й день эксперимента и была снижена на 58 % по сравнению с измерением на 1-й день ($p < 0,001$). В 3 и 10-й дни наблюдалось уменьшение количества внешних пересечений, и снижение составило соответственно 44 и 73 % ($p < 0,01$). Изменение спонтанной исследовательской активности, проявленное как поиск отверстий, было обнаружено на 10-й день со снижением на 43 % ($p < 0,05$). Количество вертикальных положений уменьшилось во все дни экспериментального испытания, и к 3 и 10-му дням снижение составило 73 и 87 % ($p < 0,01$).

В группе МУНТ-2.1 общее время двигательной активности было уменьшено в дни 3 и 10-й соответственно на 74 % ($p < 0,05$) и 77 % ($p < 0,05$). Количество внутренних пересечений поля было уменьшено в дни 3 и 10-й на 58 % ($p < 0,05$) и 74 % ($p < 0,01$). Количество внешних квадратных переходов было уменьшено на 75 % ($p < 0,01$) в день 3-й и на 84 % ($p < 0,01$) в день 10-й. Снижение вертикального положения составило 82 и 78 % ($p < 0,01$) в дни 3 и 10-й. Изменений интегральных показателей исследовательской активности в тесте «открытое поле» не наблюдалось (рис. 68).

Тест Манна-Уитни показал значительное изменение интегральных показаний в группе МУНТ-1.1 на 10-й день и в группе МУНТ-2.1 на 3-й и 10-й дни. Увеличение общего времени неподвижности наблюдалось в дни 3 и 10 на 133,1 и 95,6 % ($p < 0,01$) и на 83,4 и 101,3 % соответственно в группах МУНТ-1.1 и МУНТ-2.1.

Показатели ориентировочно-исследовательской деятельности

Индикатор	Контрольная группа			МУНТ 1.1			МУНТ 2.1		
	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день
Латентное время	-0,55±0,29	-0,15±0,16	-0,4±0,27	-0,2±0,21	0,00±0,00	-0,2±0,21	-0,1±0,1	-0,60±0,58	-0,25±0,18
Общее время двигательной активности	8,07±1,43	5,87±1,23	5,60±1,13	5,97±1,18	3,28±0,86	1,25±0,41*	7,91±1,65	2,04±0,70**	1,85±0,68**
Пересечения внутренних квадратов	11,0±2,34	15,40±2,76	25,60±5,68	9,0±3,59	10,0±2,79	3,80±1,06***	19,20±6,65	8,0±2,08**	5,0±1,81*
Пересечения внешних квадратов	24,40±3,19	28,20±7,80	22,70±4,98	25,40±5,47	14,20±5,01	6,80±2,46*	33,90±7,92	8,50±4,52*	5,50±3,05*
Кол-во заглядываний в норки	6,10±1,58	4,50±1,29	8,20±1,77	3,70±1,02	4,30±1,55	2,10±0,46**	3,90±0,87	3,70±1,10	3,30±1,20
Кол-во вертикальных стоек	8,20±3,15	12,20±4,58	14,60±4,72	16,20±2,48	4,40±1,66	2,20±1,27*	19,40±4,01	3,60±1,96	4,20±2,50*

Примечание. Значения представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистически значимые различия в ориентировочной активности отмечены как * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с днем 1.

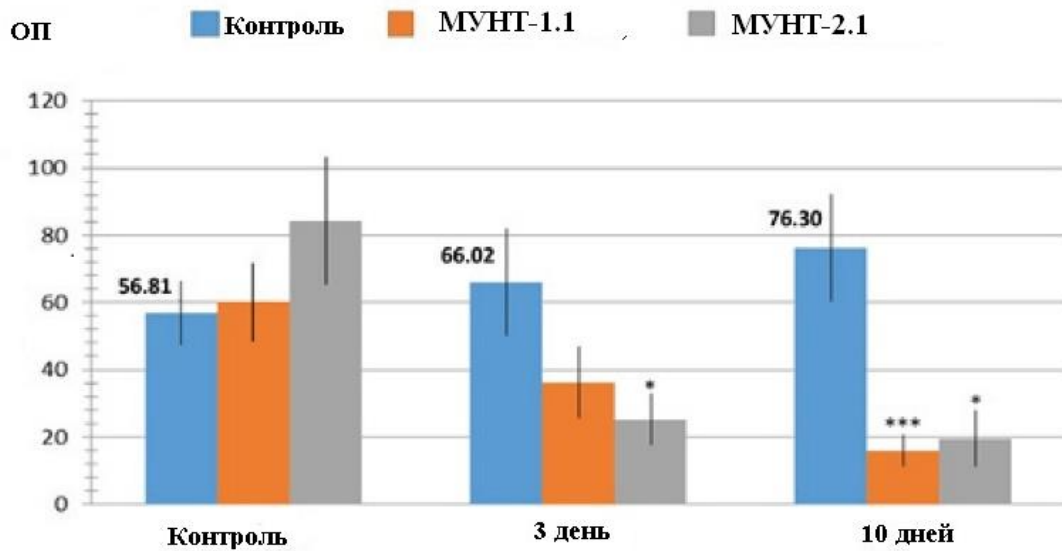


Рис. 68. Изменения интегральных показателей исследовательской деятельности в тесте «открытое поле». Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

Изменение эмоционального статуса в тесте «открытое поле» представлено на рис. 69. Значительное изменение уровней стресса у крыс Вистар ($p < 0,01$) наблюдалось после 10-го дня измерений для обеих групп.

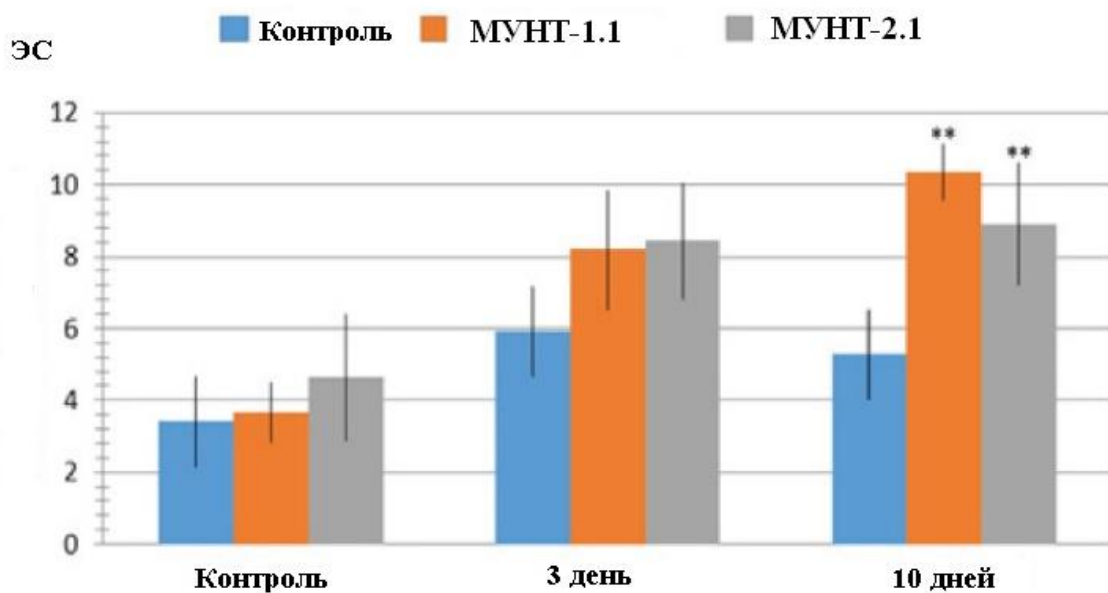


Рис. 69. Изменения эмоционального статуса крыс в тесте «открытое поле». Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем

Тест «возвышенный крестообразный лабиринт».

Результаты теста «возвышенный крестообразный лабиринт» выявили снижение показателей исследовательской активности. В группе МУНТ-1.1 на 10-й день время, проведенное в открытом рукаве, сократилось на 27 % ($p > 0,05$), время двигательной активности сократилось на 65 % ($p < 0,05$), количество изгибов – на 71 % ($p < 0,05$) и вертикальное положение – на 49 % ($p < 0,05$). В группе МУНТ-2.1 на 10-й день время, проведенное в открытых рукавах, сократилось на 57 % ($p > 0,05$), время двигательной активности уменьшилось на 70 % ($p < 0,01$), количество изгибов уменьшилось на 68 % ($p < 0,01$), а количество вертикальных положений уменьшилось на 47 % ($p < 0,05$; табл. 24).

Таблица 24

Показатели уровня стресса в трех группах

Индикатор	Контроль			МУНТ 1.1			МУНТ 2.1		
	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день
Общее время двигательной активности	2,21±0,94	4,82±1,42	4,27±1,32	3,17±0,67	7,39±1,64	9,37±0,85*	3,73±1,62	6,84±1,55	7,51±1,67
Общее число грумингов	1,20±0,60	1,00±0,35	0,90±0,46	1,20±0,43	0,80±0,38	0,50±0,32	0,90±0,33	1,30±0,54	0,90±0,67
Число болюсов	0,00±0,00	0,10±0,10	0,10±0,10	0,10±0,11	0,00±0,00	0,50±0,32	0,00±0,00	0,30±0,22	0,50±0,36

Примечание. Значения представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистически значимая разница в уровнях стресса отмечается как * $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой.

Интегральные показатели исследовательской активности в группах МУНТ-2.1 и МУНТ-1.1 снизились на 10-й день соответственно на 51 и 62 % (рис. 70). На 10-й день уровень стресса увеличился в группе МУНТ-1.1 на 3,0 %, а в группе МУНТ-2.1 – только на 0,7 %. Очевидно, что уровни стресса в экспериментальных группах не имели изменений по сравнению с начальными уровнями. По сравнению с контрольной группой, обе экспериментальные группы представили значительные различия в измерениях уровней стресса на 10-й день ($p < 0,0$) (рис. 71).

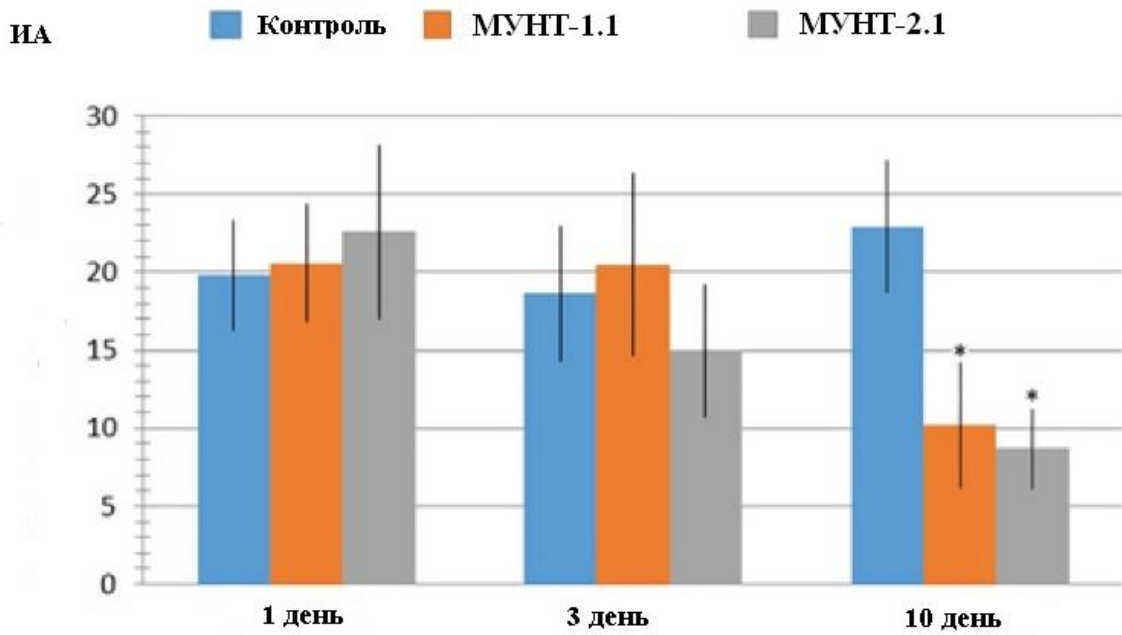


Рис. 70. Изменения интегральных показателей исследовательской активности тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

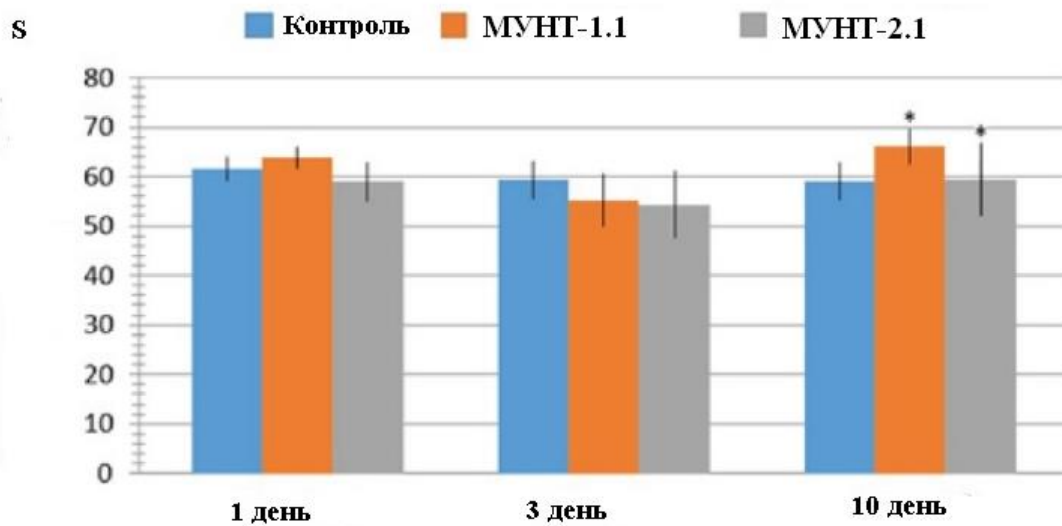


Рис. 71. Изменения уровней стресса в повышенном тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Подводя итог вышеприведенным результатам теста «приподнятый крестообразный лабиринт», отметим, что пероральное введение углеродных нанотрубок

различного диаметра в стандартной дозе 500 мг/кг снижало показатели исследовательской активности, в то время как уровень стресса у крыс оставался относительно постоянным.

Тест УПК

Анализ результатов теста УПК выявил снижение мотивационных и энергетических показателей исследовательской активности в экспериментальных группах. Поисковая активность в группе МУНТ-1.1 к 3-му дню снизилась на 50,0 % ($p < 0,01$), а в группе МУНТ-2.1 указанное снижение составило 11,2 %. К 10-му дню по сравнению со значениями контрольной группы снижение составило 64 и 58 % (оба $p < 0,01$) соответственно для групп МУНТ-1.1 и МУНТ-2.1.

Динамика активных исследований была снижена на основании 10-го дня измерений. В группе МУНТ-1.1 снижение составило 74,0 % ($p < 0,01$), а в группе МУНТ-2.1 – 86,1 % ($p < 0,01$). Кроме того, в тесте наблюдалась сильная тенденция у групповых крыс МУНТ-2.1 к уменьшению количества правильных пробежек и увеличению количества неправильных пробежек. Начиная с 10-го дня измерений, в двух экспериментальных группах наблюдался абсолютный отказ от исследований (табл. 25).

Таблица 25

Показатели уровня исследовательской активности в трех группах

Индикатор	Контроль			МУНТ-1.1			МУНТ-2.1		
	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные пробежки	2,70±0,50	3,00±0,67	2,00±0,47	2,50±0,61	1,50±0,6	0,00±0,00*	2,10±0,73	1,11±0,62**	0,00±0,00*
Неправильные пробежки	5,20±1,97	3,90±1,22	2,30±0,42	3,80±3,45	4,00±2,44	0,00±0,00*	2,40±0,85	3,70±2,99	0,00±0,00*
Время поиска	17,50±3,84	13,20±1,70	13,10±2,07	14,40±3,45	7,20±1,46***	5,20±1,89***	10,70±1,21	9,50±1,72	4,50±0,91***
Интенсивность поиска	4,70±1,37	5,10±1,84	4,70±0,94	5,00±1,28	5,10±1,84	1,30±0,75***	3,60±1,03	3,10±1,82	0,50±0,36***

Примечание. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистически значимые различия в уровнях исследовательской активности отмечены как * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$ и *** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой.

Изменения когнитивного индекса в течение 10-дневного экспериментального периода показаны на (рис. 72). Оценивая исследовательское поведение крыс Вистар с помощью теста УПК, было обнаружено, что 10-дневная схема перорального введения углеродных нанотрубок с различными диаметрами привела к снижению мотивационных и энергетических показателей исследовательской деятельности и когнитивных способностей (табл. 26). К 10-му дню лечение крыс линии Вистар МУНТ полностью отменило их исследовательскую активность.

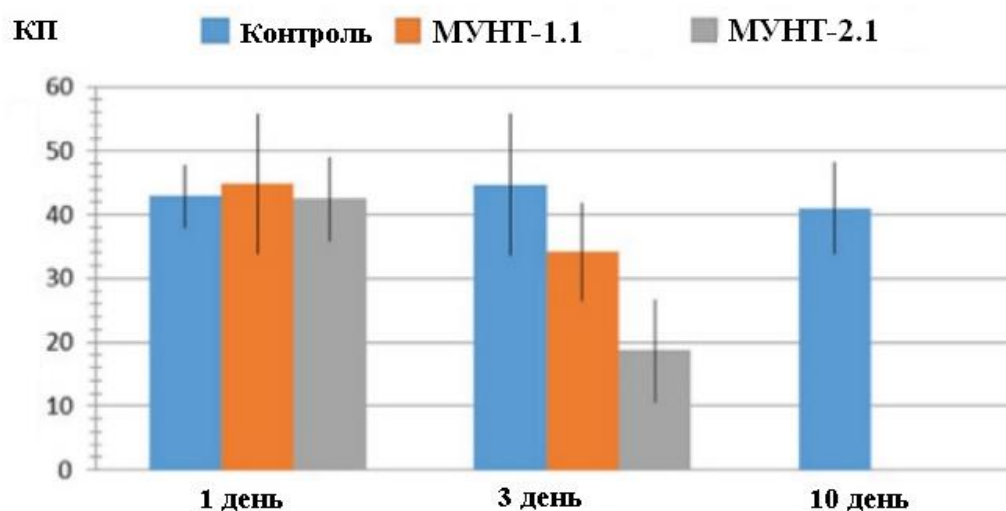


Рис. 72. Изменения когнитивного индекса в универсальном блочном тесте решения проблем Григорьева. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Таблица 26

Изменение уровня значимости в исследовании поведения крыс в УПК

Группа	День	P (уровень значимости)
МУНТ-1.1	1	0,880
	3	0,096
	10	0,001
МУНТ-2.1	1	0,880
	3	0,060
	10	0,001

Примечание. p – значения в сравнении с контролем, определенные U-тестом Манна-Уитни.

Влияние синтетических наночастиц (УНВ) на нервно-поведенческие изменения у крыс

Анализ данных теста в открытом поле выявил снижение двигательной активности на 10-й день воздействия УНВ как в группе УНВ-2.1, так и в группе УНВ-2.2

по сравнению с контролем (табл. 27). Результаты показали, что к 10-му дню применения УНВ-2.1 и УНВ-2.2 общая двигательная активность была значительно снижена соответственно на 3,44 с ($p < 0,01$) и 2,99 с ($p < 0,01$) по сравнению с первым днем тестирования. Интегральная оценка разведочной активности в открытом поле представлена на (рис. 73).

Используя интегральный анализ, никаких существенных изменений в исследовательской деятельности не обнаружено. В дополнение к исследовательскому поведению мы также проанализировали поведенческие особенности, которые классифицируются как индикаторы тревоги (табл. 27 и рис. 73). Данные табл. 27 показывают, что применение УНВ-2.1 оказывает существенное влияние на поведение при замораживании, которое значительно улучшается на 10-й день: общее время замораживания увеличивается в 19 раз при сравнении значений с 1-го и 10-го дня испытаний (от 0,11 до 2,18). Применение интегрального анализа для параметров тревожности, записанных в условиях открытого поля, предполагает, однако, что оба типа УНВ не оказывают существенного влияния на соответствующее общее поведение.

Не было значительной разницы в дни испытаний 1, 3 и 10-й в открытом поле. Изменения в поведении, связанные с тревогой, в открытом поле в разных экспериментальных группах показаны на (рис. 73). Результаты, полученные в тесте с возвышенными лабиринтами, представлены в следующих параграфах. Параметр двигательной активности показал снижение в группе УНВ-2.1 на 3-й день ($p < 0,05$) и в группе УНВ-2.2 на 3-й и 10-й дни эксперимента по сравнению с первым днем тестирования. В группе УНВ-2.1 двигательная активность была снижена на 1,44 с на 3-й день испытаний по сравнению с первым днем, а на 10-й день снижение составило 1,63 с. Соответствующее снижение составило 2,43 с в группе УНВ-2.2 на 10-й день испытаний. В группе УНВ-2.2 количество изгибов уменьшилось на 8,90 ($p < 0,01$) и 12,5 ($p < 0,001$) соответственно в дни испытаний 3 и 10-й по сравнению с первым днем испытания (рис. 74).

Параметры, которые более специфичны для поведения, связанного с тревогой, в приподнятом плюсовом лабиринте, не показали каких-либо статистически значимых различий (табл. 28 и рис. 74). На 10-й день наблюдалось значительное

снижение ЭА в группе УНВ-2.2 на 12,5 балла ($p < 0,01$), и не было значимого различия ARB в тестовые дни 1, 3 и 10.

Исследовательская активность и параметры тревожности групп, получавших УНВ-2.1 и УНВ-2.2, и контрольных животных в открытом поле

Показатель	Контрольная группа			Группа, получавшая УНВ-2.1			Группа, получавшая УНВ-2.2		
	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день
Исследовательская деятельность									
Время задержки, с	0	-0,25±0,26	0	-0,10±0,07	0	-0,05±0,05	0	0	-0,10±0,10
Общее время двигательной активности, с	4,48±0,41	3,39±0,40	2,92±0,27	4,89±0,42	3,06±0,40	1,45±0,33 **	5,01±0,26	3,14±0,31	2,02±0,19 **
Пересечение внутренних площадей (количество актов/3 мин)	7,00±1,70	13,80±3,87	7,00±2,31	12,60±3,03	14,20±3,41	12,80±3,63	13,00±2,46	16,80±2,69	11,60±2,10
Пересечение внешних площадей (количество актов/3 мин)	44,50±5,38	38,40±3,50	30,80±2,74	40,10±3,59	39,20±6,50	23,50±4,69	38,00±3,36	37,90±3,80	29,70±2,91
Количество просматривающих лунок (количество актов/3 мин)	5,30±0,74	6,20±1,53	2,60±0,45	7,30±1,19	5,80±0,49	2,80±0,41	5,70±0,72	5,70±1,10	3,70±0,54
Количество тылов (количество актов/3 мин)	17,80±3,70	10,60±2,69	14,60±3,62	20,20±2,44	14,00±4,94	13,40±4,02	17,40±2,49	17,20±3,05	16,20±2,44
Параметры тревоги									
Общее время замораживания (мин)	0,23 ± 0,19	1,09 ± 0,60	0,72 ± 0,30	0,11 ± 0,05	0,92 ± 0,26	2,18 ± 0,79 *	0,07 ± 0,04	0,84 ± 0,48	1,30 ± 0,47
Общее количество груминга (количество)	1,90 ± 0,48	2,10 ± 0,37	1,80 ± 0,31	2,20 ± 0,52	1,90 ± 0,33	0,80 ± 0,38	2,70 ± 0,50	1,40 ± 0,45	2,30 ± 0,63
Сумма болусов (чисел)	0,10 ± 0,10	0	0	0,10 ± 0,105	0	0	0	0	

Примечание. Значения считаются статистически значимыми; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

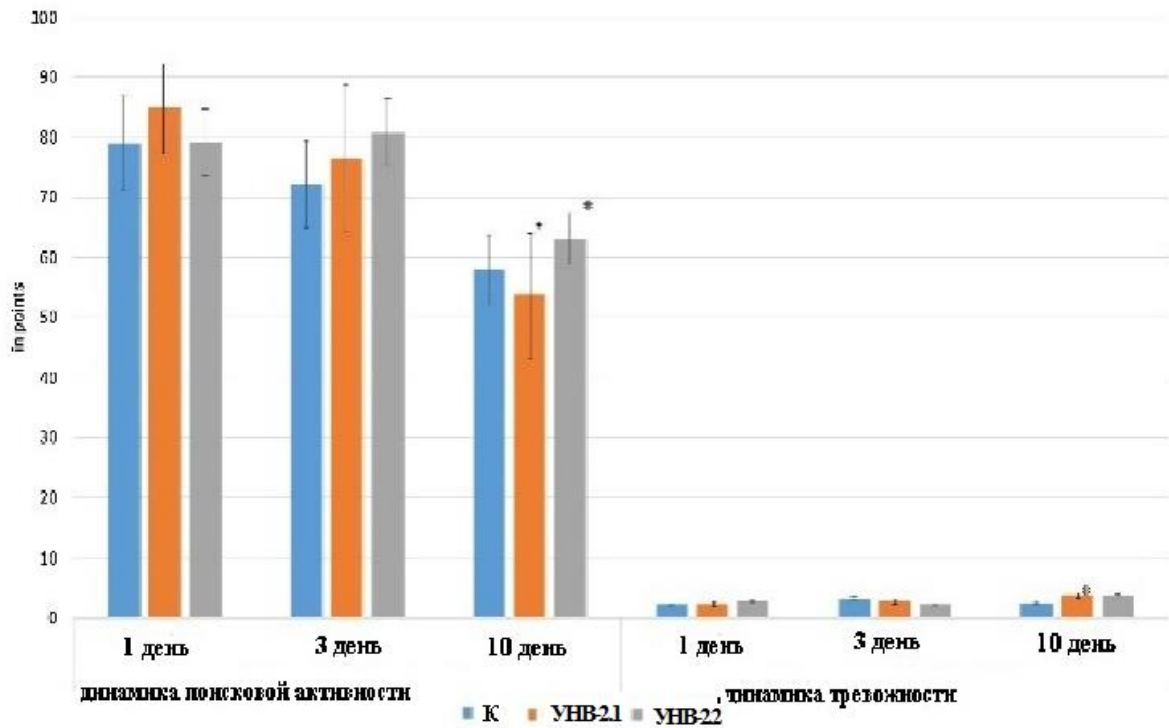


Рис. 73. Динамика исследовательской активности и поведения, связанного с тревогой, представлена как интеграл по нескольким поведенческим компонентам врожденного поведения в тестовые дни 1, 3 и 10 в открытом поле

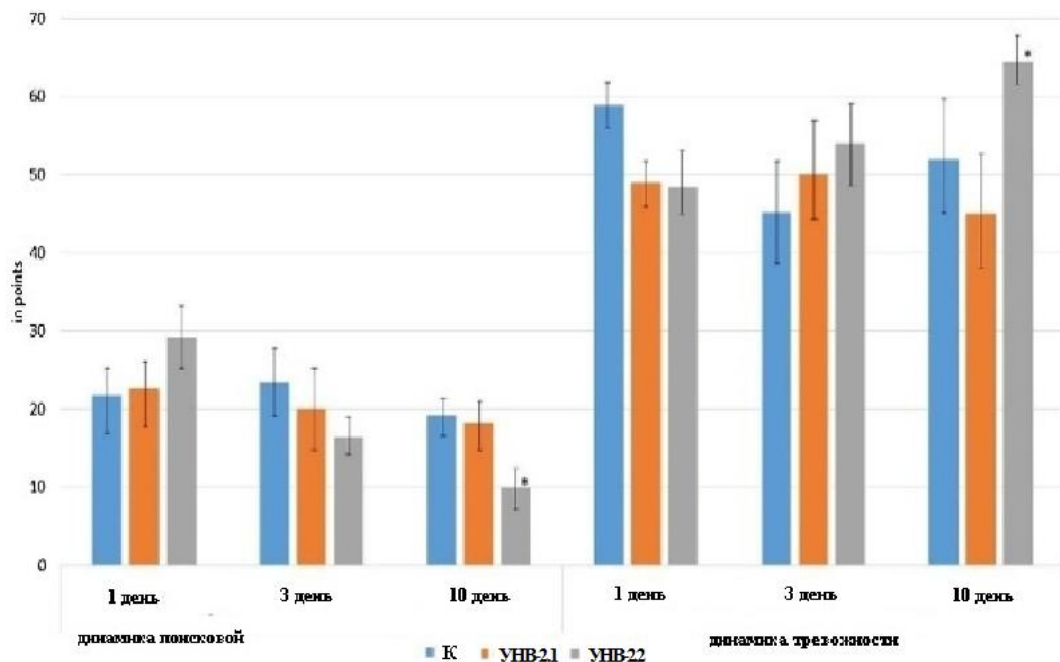


Рис. 74. Динамика поисковой активности и поведения, связанного с тревогой, представлена как интеграл по нескольким поведенческим компонентам врожденного поведения в тестовые дни 1, 3 и 10 тестирования в «приподнятом крестообразном лабиринте».

Исследовательская активность и параметры тревожности групп, получавших УНВ-2.1 и УНВ-2.2, и контрольных животных в приподнятом лабиринте

Показатель	Контрольная группа			Группа, получавшая УНВ-2.1			Группа, получавшая УНВ-2.2		
	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день
Исследовательская деятельность									
Время, проведенное в открытой руке, с	3,29±0,99	6,88±1,74	5,21±1,89	5,92±1,06	5,83±1,52	6,82±1,86	6,02±1,36	4,64±1,26	2,01±0,860
Общее время двигательной активности, с	3,54±0,31	2,33±0,20	2,01±0,26	3,09±0,16	1,65±0,18*	1,46±0,21	3,76±0,35	1,72±0,19*	1,33±0,23*
Количество воспитания (количество актов/3 мин)	4,90±1,84	3,50±1,07	4,00±1,30	3,30±0,83	5,70±1,62	4,90±1,28	4,60±1,18	4,20±1,21	4,30±1,18
Количество изгибов (количество актов/3 мин)	10,10±1,38	11,10±1,89	7,80±1,12	10,30±1,71	6,90±1,61	5,00±0,86	14,80±2,58	5,90±0,81*	2,30±0,54***
Параметры тревоги									
Время, проведенное в закрытых рукавах, с	58,84±3,98	42,76±6,41	51,16±7,55	48,32±4,26	48,68±6,06	44,72±7,44	47,91±5,43	53,44±5,04	63,96±3,45
Общее количество груминга (количество)	0,10±0,10	0,60±0,36	0,80±0,54	0,50±0,23	1,30±0,45	0,30±0,16	0,40±0,17	0,60±0,42	0,40±0,23
Сумма болусов (чисел)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. Значения считаются статистически значимыми; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

Таким образом, результаты тестов поведенческих систем для анализа врожденного поведения позволяют предположить, что УНВ вызывает снижение двигательной активности после многократного перорального введения в дозе 500 мг/кг. Однако общий уровень тревоги, похоже, не затронут. Результаты тестирования крыс в УПК представлены в (табл. 29, рис. 75).

Таблица 29

Средние значения переменных для мотивации и познания, рассчитанные по данным универсального блока для решения проблем для групп УНВ-2.1 и УНВ-2.2 и контрольных животных

Показатель	Контрольная группа			Группа, получавшая УНВ-2.1			Группа, получавшая УНВ-2.2		
	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные забеги (цифры)	6,00±0,00	5,40±0,36	6,00±0,00	5,40±0,63	5,40±0,45	4,30±0,82	5,90±0,10	5,50±0,42	6,00±0,00
Ложные забеги (числа)	7,60±3,21	4,80±1,03	7,50±2,62	6,80±2,83	5,10±1,22	6,90±2,22	9,70±3,07	4,20±1,40	10,10±4,50
Время поиска, с	11,10±1,74	9,80±0,87	6,40±1,01	11,60±1,42	11,10±0,95	7,90±1,63	10,40±1,04	9,80±1,07	9,00±1,59
Интенсивность поиска (количество актов/3 мин)	15,30±5,22	16,60±3,17	14,00±2,61	13,00±3,06	9,60±1,45	11,70±3,13	14,20±2,85	9,80±1,80	17,20±4,63

Анализ данных, собранных из теста УПК, показывает, что 14 дней применения УНВ не оказывают существенного влияния на параметры познания и мотивации. Как описано выше, в дополнение к функциональным/поведенческим переменным мы также исследовали, влияют ли на уровни интерлейкина пероральный прием УНВ. Результаты анализа образцов крови, взятых в экспериментальный день 11-й, представлены в табл. 30.

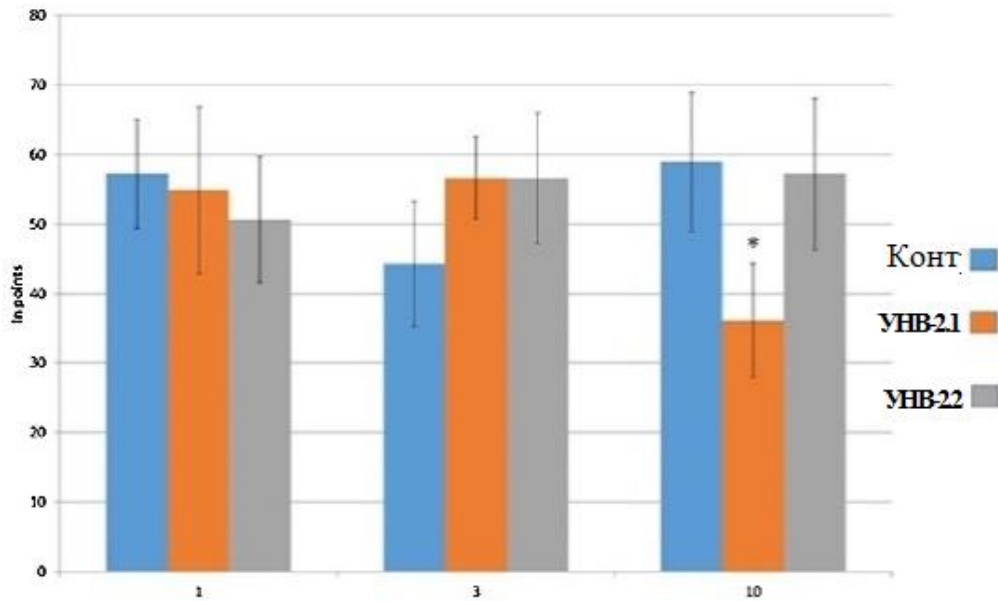


Рис. 75. Динамические изменения интеграла когнитивных переменных в универсальном блоке решения задач в 1, 3 и 10-е дни испытаний в контрольной и экспериментальной группах

Таблица 30

Концентрация интерлейкинов в плазме крови крыс контрольной и опытной групп

Группа	ИЛ-6 (пг/мл)	ИЛ-8 (пг/мл)	ИЛ-1 β (пг/мл)	ИЛ-10 (пг/мл)	ИЛ-18 (пг/мл)
Контроль	0,009 \pm 0,010	-	3,050 \pm 0,760	0,838 \pm 0,190	125,570 \pm 13,70
УНВ-2.1	0,688 \pm 0,190	0,128 \pm 0,140	4,600 \pm 0,990	2,019 \pm 0,360*	202,60 \pm 49,520
УНВ-2.2	0,306 \pm 0,030	0,080 \pm 0,080	4,740 \pm 1,410	2,817 \pm 0,330*	202,97 \pm 83,970

* $p < 0,05$, контроль в сравнении с группой, подвергшейся воздействию, нановолокон: не обнаруживается.

Обзор биохимического профиля различных интерлейкинов в плазме крови показал увеличение специфических цитокинов в экспериментальных группах по сравнению с контрольной. Статистически значимые различия были выявлены в обеих обработанных группах УНВ-2.1 и УНВ-2.2 для интерлейкина-6. В группах, получавших УНВ-2.1 и УНВ-2.2, концентрация была в 2,4 и 3,4 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Концентрация интерлейкина-10 в плазме также была значительно выше в обеих обработанных группах по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Влияние синтетических наночастиц (УНВ) на морфологические изменения в почках и селезенке у крыс

Для изучения влияния УНВ на морфологическую структуру внутренних органов вначале была оценена масса последних (табл. 31).

Таблица 31

Масса внутренних органов крыс в экспериментальных группах, подвергавшихся загрязнению разными наночастицами в концентрации 500 мг/кг в течение 14 дней и контрольной группе (К)

Группа/органы	К	УНВ-1.3	УНВ-2.2	УНВ-2.1
Почки	1,06±0,04	1,12±0,09	1,08±0,06	1,25±0,15
Селезенка	1,00±0,06	0,88±0,15	1,01±0,22	1,12±0,11

Видно, что достоверного различия между группами нет, но мы можем отметить статистически значимое повышение массы селезенки и почек в группе УНВ-2.1.

Гистологическое строение ткани почек, показанное на (рис. 76), при световой микроскопии в экспериментальных группах животных, получавших с кормом УНВ, выявило ряд отличий от контроля.

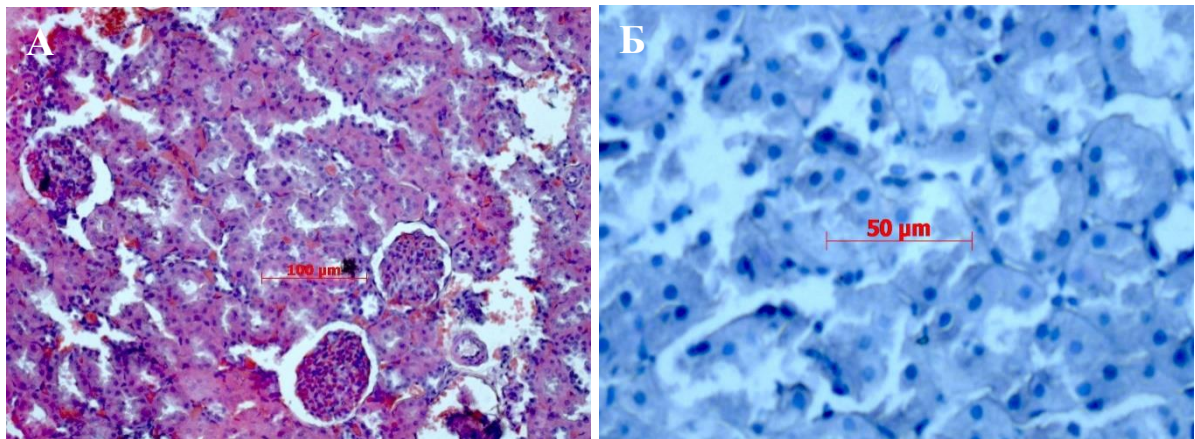


Рис. 76. Срезы ткани почек у крыс при введении УНВ разных типов в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней: **а** – ткань почки крысы в группе УНВ-1.3. Выраженная эритроцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилинэозином; **б** – ткань почки крысы в группе УНВ-2.1. Локальные некротические поражения. Окраска гематоксилинэозином. Увеличение: **а** – 200×, **б** – 400×

В ткани почек у крыс в группах УНТ-1.3, УНТ-2.2 и УНТ-2.1 отмечаются локальные некрозы, а также клеточная инфильтрация, преимущественно эритроцитарная, хотя наблюдается и лимфоцитарная (рис. 77). Сосуды полнокровны, но стаза не отмечается. Так, в ткани почек у крыс группы УНВ-2.1 обнаружены дистрофические изменения и некрозы (см. рис. 76, б). Ядра здесь не прослеживаются, границы клеток стерты.

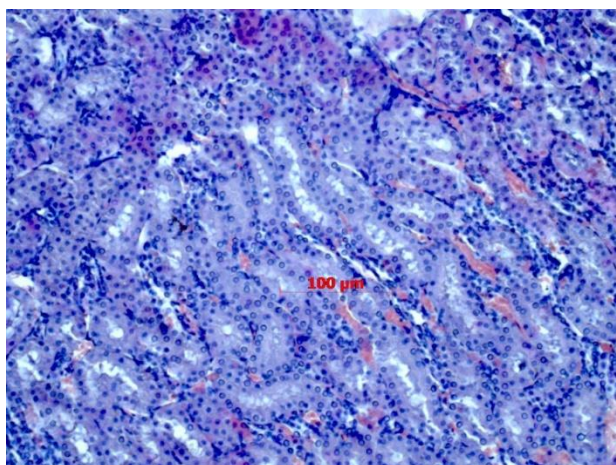


Рис. 77. Срезы ткани почек у крыс при введении УНВ-1.3 в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней. Выраженная инфильтрация и стаз в сосудах. Окраска гематоксилин-эозином. 200×

Гистологическое строение селезенки (рис. 78) при световой микроскопии в экспериментальных группах выявило ряд отличий от контроля.

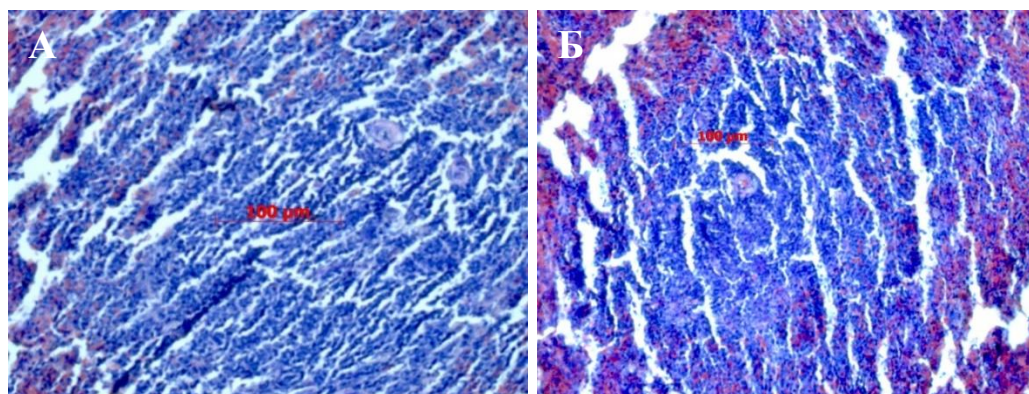


Рис. 78. Срезы тканей селезенки у крыс при введении УНВ в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней: **а** – лимфоидный фолликул в контрольной группе. Окраска гематоксилин-эозином; **б** – лимфоидный фолликул в группе УНВ-1.3. Окраска гематоксилин эозином. Увеличение 200×

Как можно видеть, лимфатические фолликулы в экспериментальных группах немного меньше, чем в контроле. Кровоизлияний не отмечено, но сосуды полнокровны (рис. 79), наблюдаются стазы. В целом красная и белая пульпа без патологических изменений.

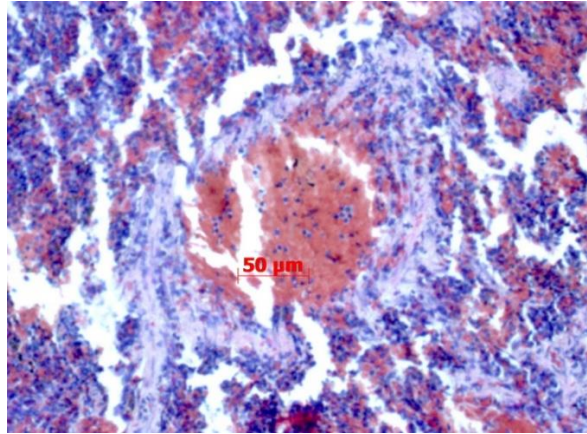


Рис. 79. Срезы тканей селезенки после введения УНВ в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней. Стаз в сосуде селезенки у крыс в группе УНВ-2.1. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 200×

Влияние синтетических наночастиц (УНВ) на морфологические изменения в пищеварительном тракте у крыс

Гистологическое строение ткани желудка (рис. 80) при световой микроскопии в экспериментальных группах животных, получавших с кормом УНВ, выявило ряд отличий от контроля. В целом в группах УНТ-1.3, УНТ-2.2 и УНТ-2.1 отмечается утолщение слизистой оболочки желудка по отношению к группе «Контроль», что является следствием механического раздражения УНВ. Подслизистая и серозная оболочки, гладкая мускулатура во всех группах без патологических изменений. Сосуды полнокровны, но стаза не отмечается.

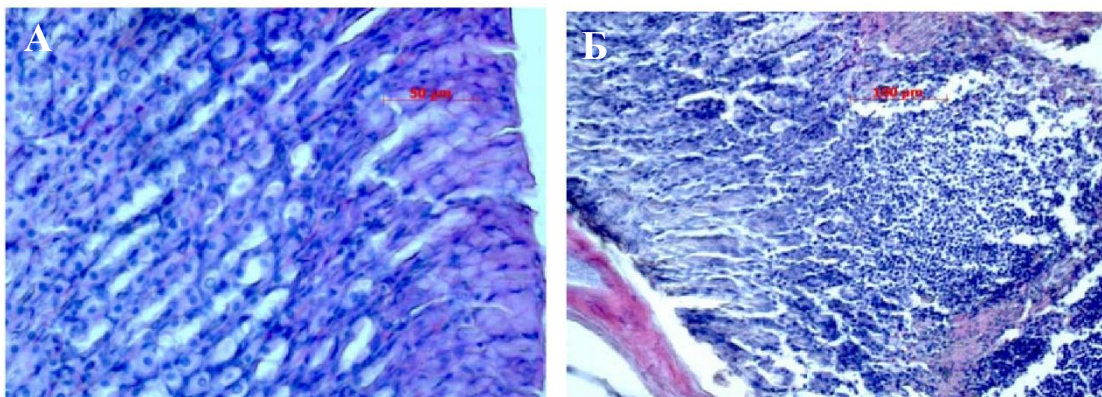


Рис. 80. Срезы слизистой оболочки желудка у крыс при введении УНВ разных типов в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней: **а** – желудок крысы в группе УНВ-2.2. Поверхностный слой слизистой желудка, отсутствуют ядра, граница клеток стерта. Окраска гематоксилин-эозином; **б** – желудок крысы в группе УНВ-2.1. Крупный лимфоидный фолликул. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение: **а** – 400×, **б** – 200×

В группе УНВ-2.2 в поверхностных слоях слизистой оболочки отмечаются дистрофические изменения и некрозы (рис. 80, а). Ядра здесь не прослеживаются, границы клеток стерты. В группе УНВ-2.1 в подслизистой оболочке наблюдаются множественные лимфоидные фолликулы (рис. 80, б). Сравнение морфометрических параметров эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах приводится в табл. 32.

Таблица 32

Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах, мкм

Группа	Длина ядра	Ширина ядра	Длина клетки	Ширина клетки
Контроль	5,11±0,46	4,46±0,46	11,55±1,50	9,05±1,46
УНВ-2.2	5,41±0,60	4,69±0,56	12,22±1,37	10,24±1,31
УНВ-1.3	5,15±0,68	4,49±0,44	11,60±1,55	9,32±1,06
УНВ-2.1	5,49±0,61	4,73±0,53	12,18±1,31	9,76±1,04

Гистологическое строение кишечника (рис. 81) при световой микроскопии в экспериментальных группах выявило ряд отличий от контроля.

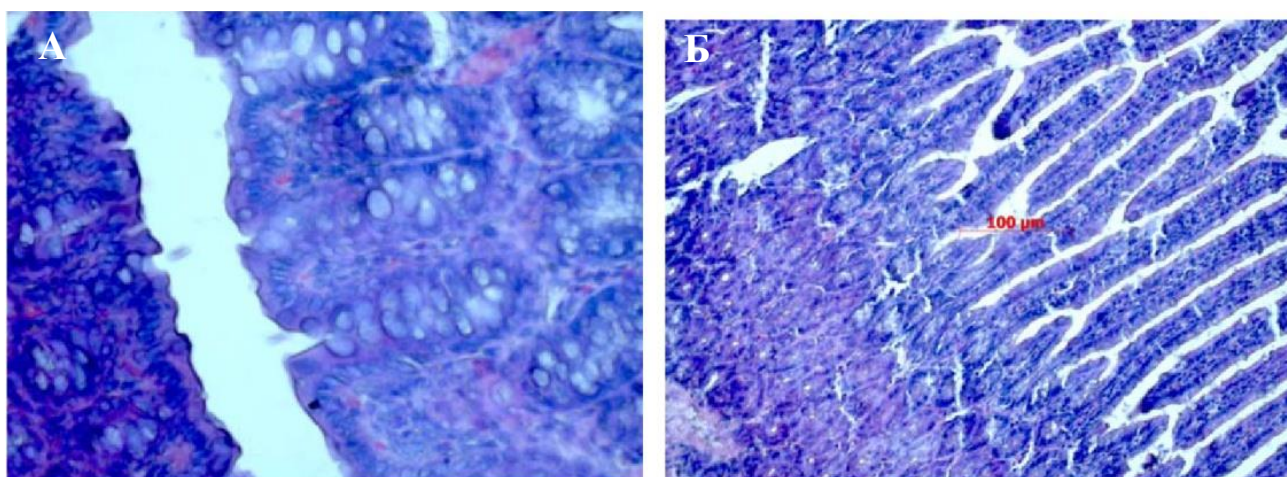


Рис. 81. Поперечный срез кишечного эпителия крыс после введения УНВ разных типов в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней, окрашенный гематоксилин-эозином. А – клетки слизистой оболочки крысы, подвергшиеся воздействию УНВ-2.2. Отмечается множество вакуолей (стрелка). Б – клетки слизистой оболочки крысы, подвергшиеся воздействию УНВ-2.1. Отмечается множество вакуолей. Увеличение: А – 400×, Б – 200×

В слизистой оболочке кишечника в группах УНВ-2.2, УНВ-1.3, УНВ-2.1 наблюдается выраженное слизеобразование. В эпителии множество бокаловидных клеток с вакуолями, заполненными слизью (рис. 81). Сосуды полнокровны. В группе УНВ-1.3 и УНВ-2.1 в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликулов. Других патологических изменений не обнаружено. Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в контрольной группе и при введении УНВ разных типов приведены в табл. 33.

Таблица 33

Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника и их ядер в экспериментальных группах животных, мкм

Группа	Длина ядра	Ширина ядра	Длина клетки	Ширина клетки
Контроль	4,96±0,66	3,81±0,65	14,34±2,97	8,64±2,28
УНВ-2.2	5,63±1,07	4,12±0,85	16,50±2,10	7,25±1,52
УНВ-1.3	6,20±0,74	4,50±0,77	17,68±1,74	6,79±1,08
УНВ-2.1	5,36±0,74	4,20±0,70	14,70±1,60	5,77±0,57

Ткани печени во всех экспериментальных группах не отличаются от контрольной. Не было выявлено никаких патологических признаков: дистрофии, некроза, отека, воспаления. Можно лишь отметить, что при введении УНВ наблюдаются более выраженное полнокровие сосудов и инфильтрация эритроцитами (рис. 82).

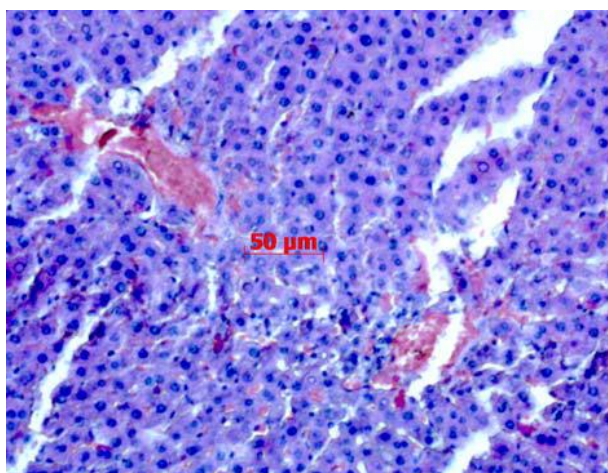


Рис. 82. Срез печени у крыс в группе УНВ-2.2 после введения УНВ в концентрации 500мг/кг и экспозиции 14 дней. Отмечаются полнокровие и инфильтрация эритроцитами. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 200×

Морфометрические параметры гепатоцитов в контрольной и экспериментальных группах приводятся в табл. 34.

Таблица 34

Морфометрические параметры гепатоцитов в экспериментальных группах животных, мкм

Группа	Длина ядра	Ширина ядра	Длина клетки	Ширина клетки
Контроль	6,23±0,56	5,67±0,52	15,90±1,47	13,30±1,73
УНВ-2.2)	6,59±0,57	5,89±0,40	15,32±1,05	13,29±1,02
УНВ-1.3	6,61±0,63	5,85±0,72	15,75±1,30	13,48±2,13
УНВ-2.1	6,45±0,39	5,83±0,40	15,10±1,36	12,84±1,36

Как можно видеть по нашим результатам, разные виды УНВ оказывают выраженное влияние на гистологическое строение органов пищеварения при пероральном введении. Так, подслизистая и серозная оболочки желудка, гладкая мускулатура во всех группах без патологических изменений. Но в слизистой оболочке всех экспериментальных групп (УНВ-2.2, УНВ-1.3, УНВ-2.1) наблюдается утолщение по отношению к группе «Контроль».

В кишечнике крыс всех экспериментальных групп наблюдается множество бокаловидных клеток с вакуолями, заполненными слизью (см. рис. 81), и как следствие, выраженное слизиобразование, сосуды полнокровны, что является следствием механического раздражения нановолокнами. Ткань печени отреагировала

менее выражено: можно лишь отметить, что при введении УНВ наблюдается более выраженное полнокровие сосудов и инфильтрация эритроцитами.

Есть также реакция иммунной системы: при введении УНВ-1.3, УНВ-2.1 в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликул. Выраженное токсическое свойство, связанное, по-видимому, как и другие обнаруженные эффекты, с механическим повреждением ткани, заключается в дистрофических изменениях и некрозах слизистой в группе КМ2. Возможно, это связано с меньшим размером УНВ, возникающим при размоле, и высокой площадью поверхности агрегатов (до $8983,11 \text{ см}^2/\text{см}^3$).

Глава 5. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛОВ

5.1. Воздействие наночастиц на основе металлов на одноклеточные организмы

Мы исследовали влияние наночастиц на основе металлов на организмы из группы продуцентов: типичные представители фитопланктона Японского моря (*Attheya ussuriensis*, *Heterosigma akashiwo*, *Chaetoceros muelleri*, *Porphyridium purpureum*). Так как продуценты являются первым звеном в любой пищевой цепи, нашей задачей было оценить экологическое влияние на них различных видов наноматериалов с возможным ранжированием этого влияния.

Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC₆ снижается на 50 % (EC₅₀) в сравнении с контролем. Величины EC₅₀, полученные на основе данных проточной цитометрии и рассчитанные в программном пакете GraphPad Prism 7.04, представлены в табл. 35–38.

Таблица 35

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *A. ussuriensis*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
CdS	–	189,2 (197,4–198,9)	61,8 (61,4–62,2)	65,3 (64,8–65,7)	145,5 (144,2–146,8)	151,3 (142,8–160,5)	116,7 (116,0–117,3)
ZnS	206 (196,6–216,2)	108,2 (107,0–109,3)	42,9 (42,6–43,3)	77,9 (75,9–80,0)	~410	–	~593

* Здесь и в табл. 35–38 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

** Здесь и в табл. 35–38 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC₆, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.

Изменения показателей физиологического состояния клеток *H. akashiwo* под воздействием наночастиц CdS и ZnS на флуоресценцию четырех видов микроводорослей представлено на (рис. 83) (за 100 % принято измерение группы контроля для каждого вида водорослей).

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *H. akashiwo*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
CdS	228,3 (223,0–233,9)	180,8 (180,1–181,4)	38,8 (38,4–39,1)	27 (26,5–27,6)	195,3 (193,8–196,8)	106,4 (100,7–112,5)	101 (99,5–102,2)
ZnS	132,9 (130,6–135,3)	119,3 (117,5–121,3)	27,9 (27,6–28,2)	97,2 (94,7–99,8)	375,1 (373,6–376,7)	163,7 (162,4–165)	224,8 (221,4–228,3)

CdS и ZnS показали снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла для данного вида водорослей.

Таблица 37

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
CdS	~511	10,4 (10,2–10,5)	3 (2,9–3,1)	~235	–	264,7 (264,0–265,4)	61,1 (58,5–63,8)
ZnS	131,7 (131,1–132,3)	21,4 (20,9–21,9)	4,2 (4,1–4,2)	–	–	51,9 (51,1–52,6)	~367

У *H. akashiwo*, наоборот, CdS и ZnS вызвали увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a*. Для *C. muelleri* не было зафиксировано изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла для исследуемых наночастиц при концентрации 100 мг/л. Для *P. purpureum* на фотосинтез микроводоросли наиболее выраженный эффект проявили CdS.

Таблица 38

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
CdS	225,8 (224,7–226,9)	50,3 (48,7–51,9)	41,5 (40,5–42,5)	–	63,6 (63,1–64,1)	32,6 (32,3–32,9)	51,3 (50,8–51,8)
ZnS	44,6 (44,3–45)	> 1000	197,5 (191,3–204,1)	–	–	–	Увеличение на 19–21 %**

Изменение размера клеток водорослей при воздействии исследуемых видов наночастиц представлено на рис. 84.

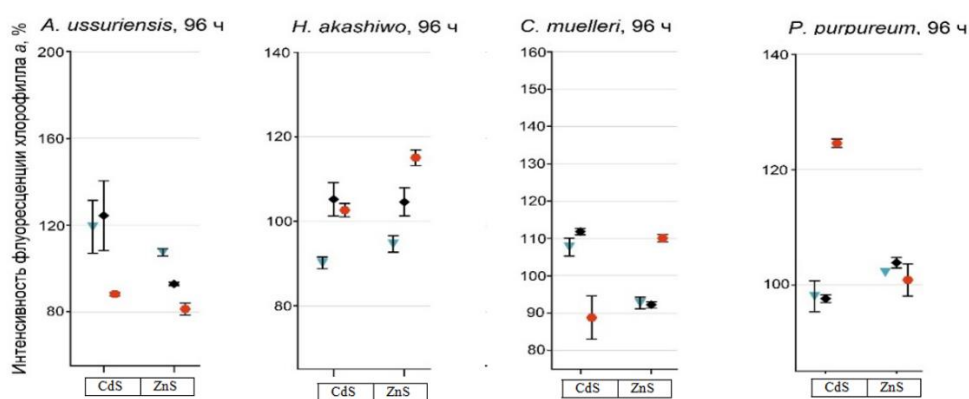


Рис. 83. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* четырех видов морских микроводорослей при воздействии исследуемых наночастиц (96 ч^{*}). * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (символом отмечено значение медианы, границы доверительного интервала показаны на графиках)

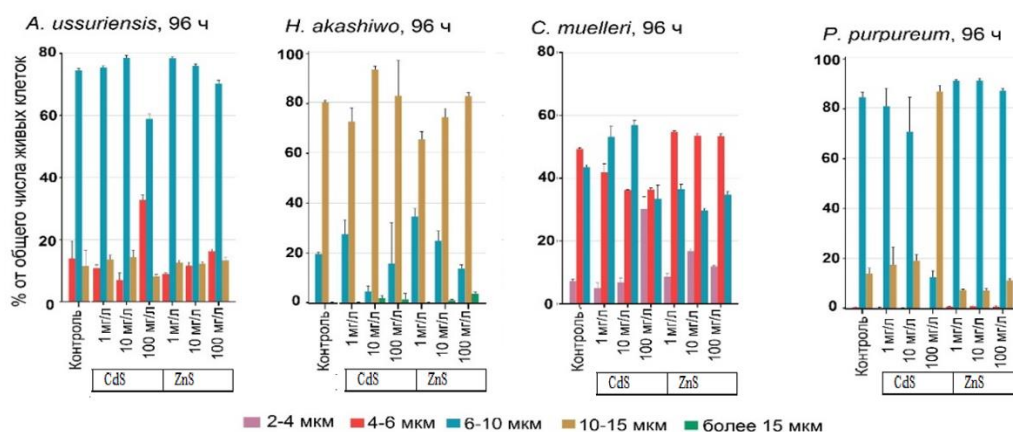


Рис. 84. Изменение размера клеток четырех видов морских микроводорослей при воздействии наночастиц (96 ч^{*}). * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала показаны на диаграммах)

5.2. Воздействие наночастиц на основе металлов на беспозвоночных

Мы исследовали влияние металлических наночастиц на разные организмы:

- иглокожие (морской еж *Strongylocentrotus intermedius*);
- двустворчатых моллюсков (*Modiolus modiolus*, *Crenomytilus grayanus*, *Arca boucardi*);
- членистоногие (*Alloperla deminuta*);

Влияние металлических наночастиц на личинки морского ежа

Для оценки воздействия на развитие эмбрионов морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1864) нами были выбраны 4 распространенных типов металлических наночастиц. В биоиспытаниях были протестированы нанокристаллы сульфидов кадмия и цинка (CdS, ZnS), наночастицы золота (Au) и наночастицы диоксида титана (TiO₂).

При оценке оплодотворяющей способности спермиев морского ежа *S. intermedius* после воздействия наночастиц, только наночастицы Au ингибировали активность спермиев при концентрациях 500 и 1000 мкг/мл. Для сравнения уровня токсичности всех исследуемых образцов наночастиц были рассчитаны концентрации EC₅₀, при которых оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа снижается на 50 % и происходит гибель 50 % эмбрионов в сравнении с контролем (табл. 39). Динамика нарушения развития и гибель яйцеклеток при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/мл показаны на (рис. 85).

Таблица 39

Средние расчетные концентрации (EC₅₀) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

Образец наночастиц	Оплодотворяемость яйцеклеток, EC ₅₀ , мкг/мл*	Гибель эмбрионов, EC ₅₀ , мкг/мл				
		2 ч*	4 ч*	6 ч**	24 ч***	48 ч***
CdS	131,9 (44–942)	26,6 (9–69)	22,3 (5–74)	18,3 (2–80)	21,6 (1–117)	10,6 (0,1–92)
ZnS	119,4 (36–1027)	35,8 (5–202)	28,2 (4–144)	22,1 (1–145)	15,7 (1–170)	10,6 (0,1–114)
Au	182,1 (108–362)	46,5 (14–173)	42,5 (12–160)	31,7 (7–122)	15,1 (1–98)	4,3 (0,1–30)
TiO ₂	620,6 (484–845)	232 (147–426)	192,9 (123–341)	161,8 (101–288)	51,6 (21–47)	32,3 (6–155)

Примечание. В скобках приведены значения EC₅₀ с доверительной вероятностью 95 %; *p < 0,0001; **p < 0,001; ***p < 0,05.

При оценке влияния наночастиц на оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* отмечено, что наиболее существенное влияние на формирование оболочки оплодотворения оказали образцы CdS, ZnS и Au. Гибель оплодотворенных яйцеклеток увеличивалась с течением времени при воздействии всех исследуемых образцов наночастиц. Наибольшая гибель оплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* отмечена при воздействии образцов CdS, ZnS и Au.

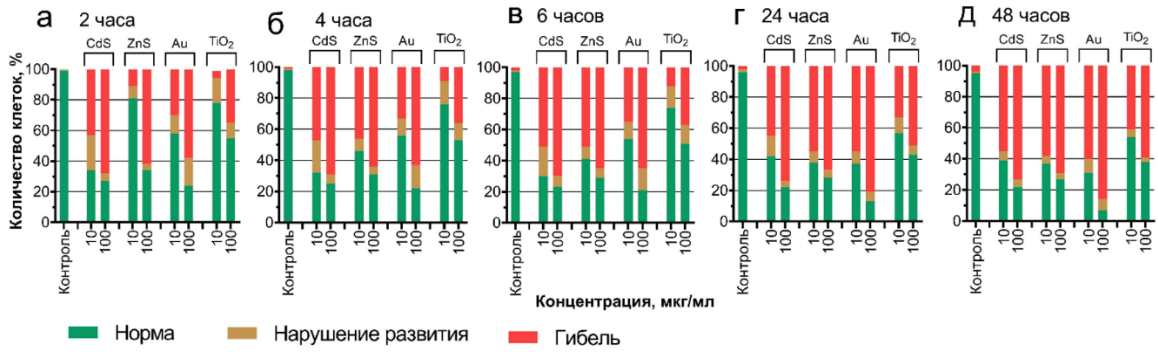


Рис. 85. Гибель и нарушение развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius* при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/л: а — 2 ч; б — 4 ч; в — 6 ч; г — 24 ч; д — 48 ч

Воздействие металлических наночастиц на гемоциты морских моллюсков

Цитотоксичность

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия НЧ представлены на рис. 48 (стр. 144). Для каждого испытуемого вида только НЧ, которые вызвали наблюдаемые изменения в жизнеспособности гемоцитов, представлены на рис. 48 (стр. 144).

НЧ на основе металлов (CdS, ZnS, Au НЧ и TiO₂) показали наибольшую цитотоксичность среди всех испытанных образцов. НЧ CdS и ZnS продемонстрировали выраженный цитотоксический эффект на гемоциты всех трех видов моллюсков рис. 48 (стр. 144). Более того, токсичность образца НЧ ZnS для *C. grayanus* и *A. boucardi* значительно увеличилась после 6 ч воздействия рис. 48, с, i, (стр. 144). Au-НЧ сильно повлияли на гемоциты двух видов, а именно *M. modiolus* и *A. boucardi* (рис. 48, d-i, стр 144), но не оказывал влияния на *A. boucardi* (рис. 48, g, h, i, стр. 144). TiO₂ НЧ вызывали значительную смертность гемоцитов *C. grayanus* и *M. modiolus* (рис. 48, a-f, стр. 144). Но для *A. boucardi* НЧ TiO₂ проявлял относительно низкий цитотоксический эффект, который наблюдался только после 6 ч экспозиции до самой высокой концентрации НЧ, 1000 мг/л (рис. 48, i, стр. 144).

Изменения мембранной поляризации

Влияние НЧ на мембранную поляризацию гемоцитов *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* представлено в виде тепловой карты (рис. 49, стр. 145). На (рис. 4, рис. 145) видны изменения поляризации мембраны гемоцитов после 6 ч воздействия при самых высоких концентрациях НЧ (250, 500 и 1000 мг/л). Средняя интенсивность флуоресценции DiOC₆, прикрепленной к клеткам контрольной группы, была принята за 100 %.

Для большинства протестированных НЧ мы можем заметить зависимость от дозы деполяризацию мембраны. Чувствительность и реакция различались между видами, и в некоторых случаях можно было наблюдать даже гиперполяризацию. Наибольшая деполяризация мембраны под влиянием всех образцов металлических (кроме TiO₂) была продемонстрирована гемоцитами *M. modiolus* в концентрации 1000 мг/л.

Среди НЧ на основе металлов наиболее выраженная деполяризация мембраны была вызвана влиянием НЧ CdS и ZnS. Деполяризация мембран гемоцитов *C. grayanus* не была зарегистрирована для этих образцов при 1000 мг/л, так как почти все клетки были мертвы (см. рис. 49, а, стр. 145). Au НЧ снижали мембранополяризацию гемоцитов *C. grayanus* и *M. modiolus* выше, чем поляризация клеток *A. boucardi*. TiO₂ вызывал гиперполяризацию мембран клеток *M. modiolus* (рис. 87).

Наблюдаемые изменения в клетках гемоцитов показали цитотоксический эффект, согласно данным на (рис. 49, стр. 145). Клетки *C. grayanus* подвергались воздействию 1000 мг/л образцов CdS, ZnS и TiO₂ в течение 6 ч (рис. 86). Гемоциты *M. modiolus*, подвергшиеся воздействию НЧ CdS, ZnS, Au и TiO₂ в тех же условиях, представлены на рис. 87. Изменения клеток *A. boucardi* после 6 ч обработки CdS, ZnS, Au и TiO₂ показаны на рис. 88.

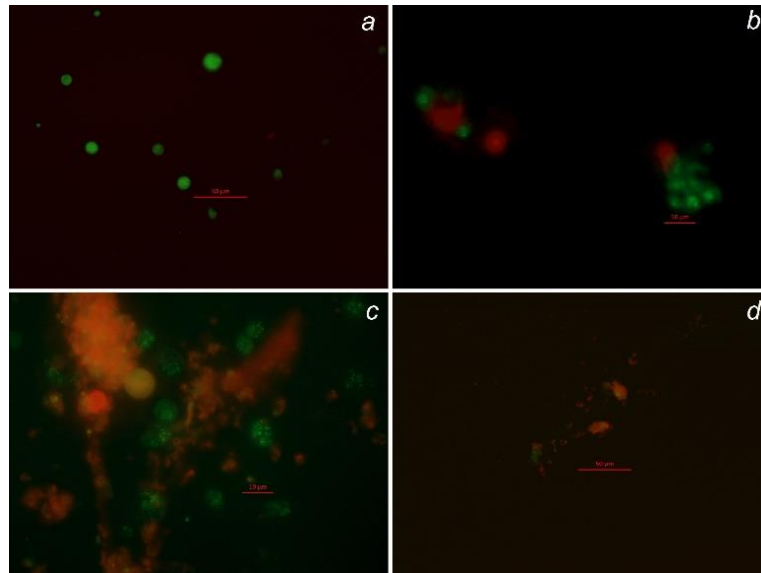


Рис. 86. Клетки гемоцитов моллюска *C. grayanus* после 6 ч воздействия НЧ в концентрации 1000 мг/л: **a** – контроль; **b** – CdS; **c** – ZnS; **d** – TiO₂

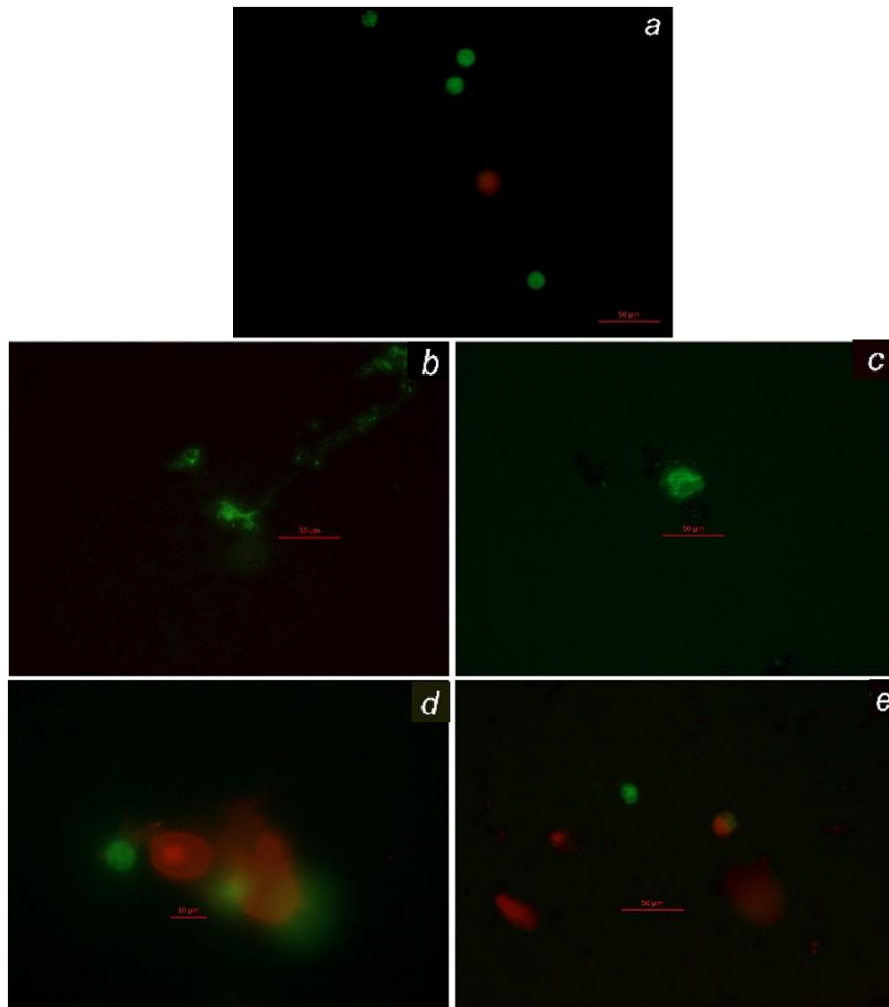


Рис. 87. Клетки гемоцитов моллюска *M. modiolus* через 6 ч воздействия НЧ в концентрации 1000 мг/л: **a** – контроль; **b** – CdS; **c** – ZnS; **d** – Au; **e** – TiO₂

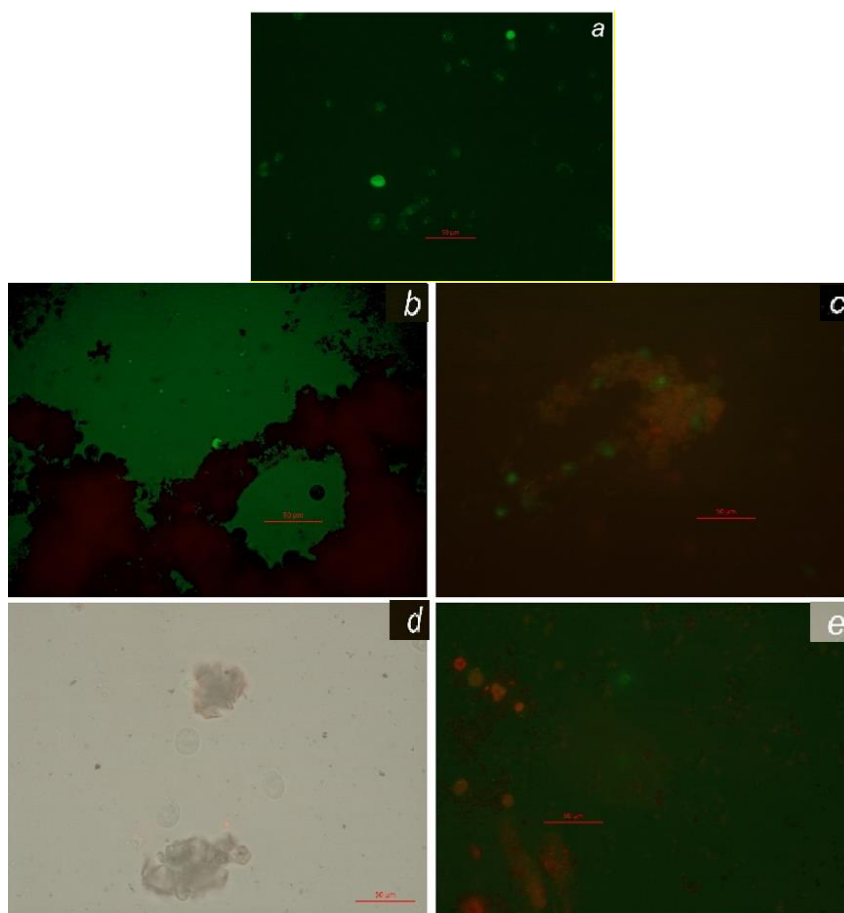


Рис. 88. Клетки гемоцитов моллюска *A. boucardi* через 6 ч воздействия с НЧ в концентрации 1000 мг/л: **a** – контроль; **b** – CdS; **c** – ZnS; **d** – Au; **e** – TiO₂

Влияние наночастиц на основе металлов на беспозвоночных типа членистоногих

Изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) следующих материалов: TiO₂; Au; CdS; ZnS в концентрации: 100 мг/мл. При изучении тканей пищеварительной систем *Alloperla deminuta* не выявлено видимых патологических изменений в контрольной группе. Стенки кишечника выстланы одним слоем цилиндрического эпителия в просвете кишечника имеется разнородное содержимое разных цветов (рис. 90, а), форм и размеров. В экспериментальных группах (TiO₂; Au; CdS; ZnS) *Alloperla deminuta* также не имела видимых повреждений и имела гистологическое строение, не отличающееся от контрольной группы. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях пищеварительной систем обнаружено не было. Кишечная стенка была точно так же выстлана одним

слоем цилиндрического эпителия, как и в группе Контроль. В просвете кишечника имеется разнородное содержимое. В группе Au, в просвете кишечника находятся, предположительно, конгломераты наночастиц черного цвета, покрытые слизью (рис. 89, б).

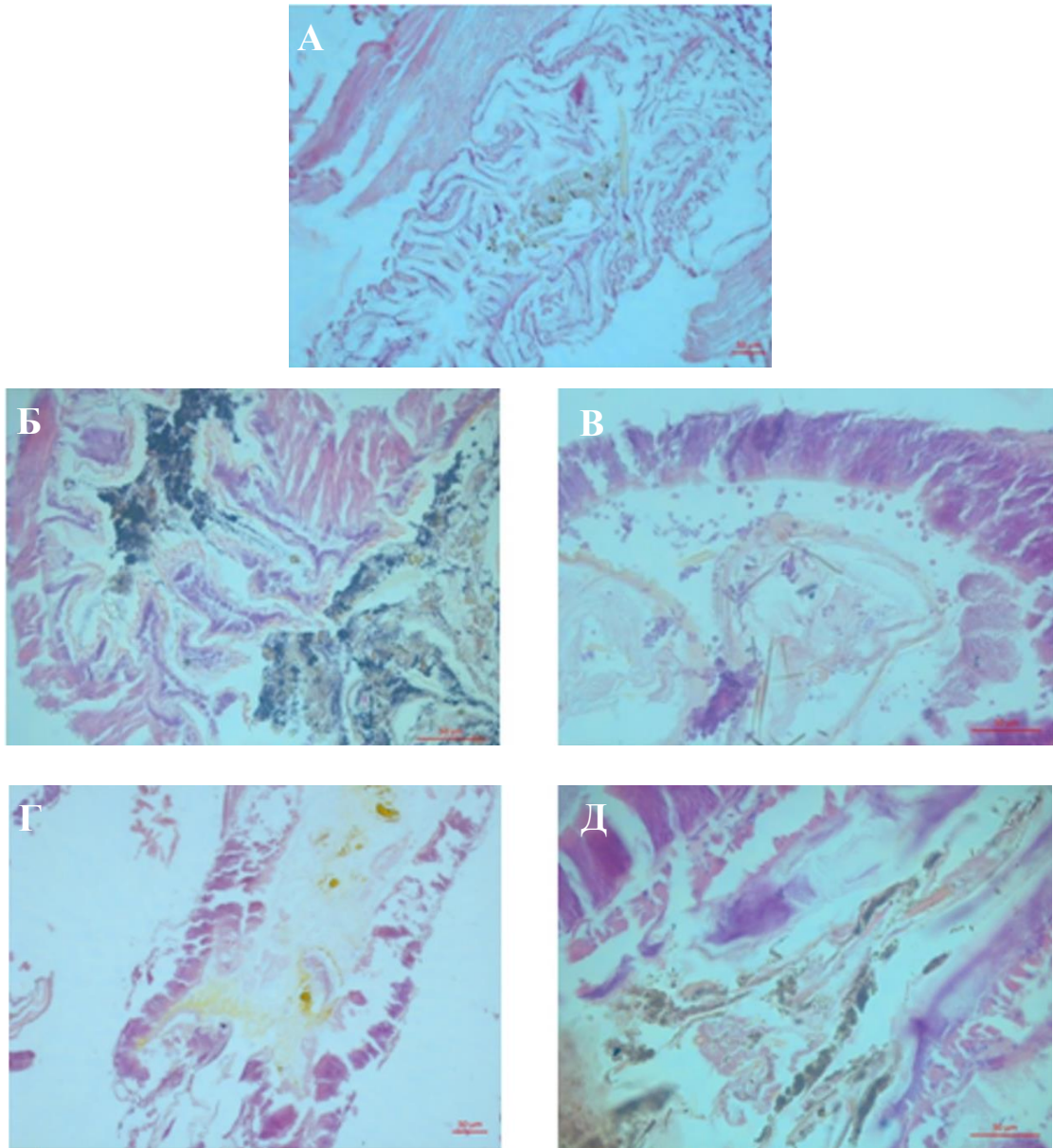


Рис. 89. Продольные срезы просвета кишечника *Alloperla deminuta*: а – контрольная группа. Конгломераты наночастиц в экспериментальных группах: б – Au; в – ZnS; г – CdS; д – TiO

В группах TiO₂, CdS; ZnS в просвете кишечника обнаружены конгломераты наночастиц меньшего размера желто-коричневого цвета, покрытые слизью (рис. 89, в, г, д). Подобные конгломераты наночастиц также редко встречались и на

поверхности хитиновой оболочки насекомых во всех группах. Проведенная морфометрия клеток кишечного эпителия (площадь, длина, ширина, периметр) не выявила статистически значимых различий во всех экспериментальных группах. Хотя достоверных отличий нет, но на разные типы наночастиц прослеживаются различные реакции клеток кишечного эпителия, как показано на рис. 90.

Наибольшее увеличение морфометрических показателей наблюдалось в группах металлических наночастиц Au, TiO, ZnS рис. 90. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты о низкой чувствительности пресноводных насекомых к загрязнению наночастицами.

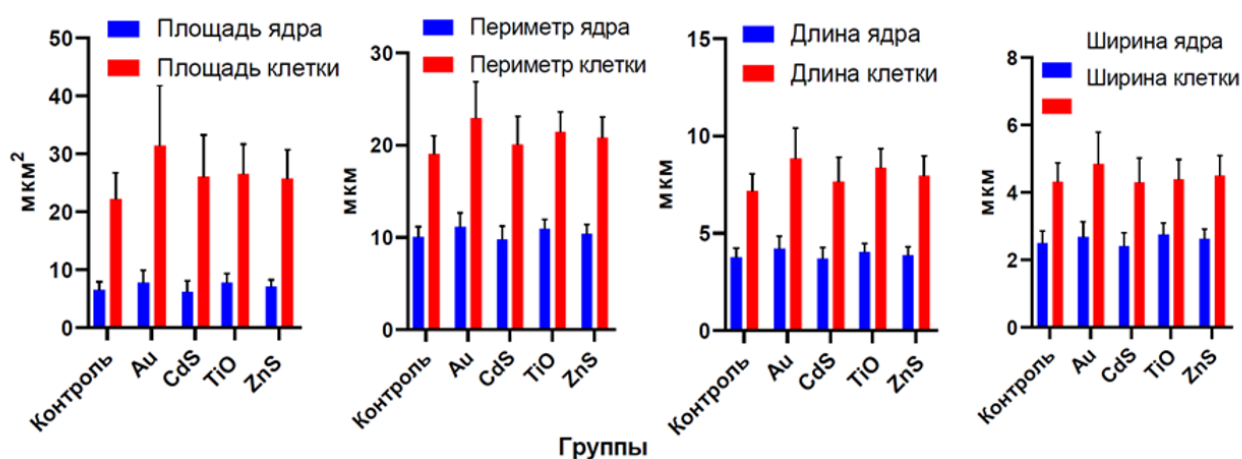


Рис. 90. Влияние наночастиц металлов на изменения размеров ядер и клеток кишечного эпителия

5.3. Воздействие наночастиц на основе металлов на млекопитающих

Пути миграции наночастиц (золото) после инъекции и механизмы их воздействия на соседние ткани у мышей

Морфологические изменения не были обнаружены в тканях мышей обеих контрольных групп: типичная структура соединительной ткани, стенок сосудов, мышечной ткани, кожи и паховых лимфатических узлов бедра была обнаружена во все периоды исследования (рис. 91). Анализ материала, собранного на 2-й день у

экспериментальных мышей, показал выраженную периваскулярную лейкоцитарную инфильтрацию вокруг стенок сосудов в очаге загрязнения НЧ в ткани (рис. 92, а).

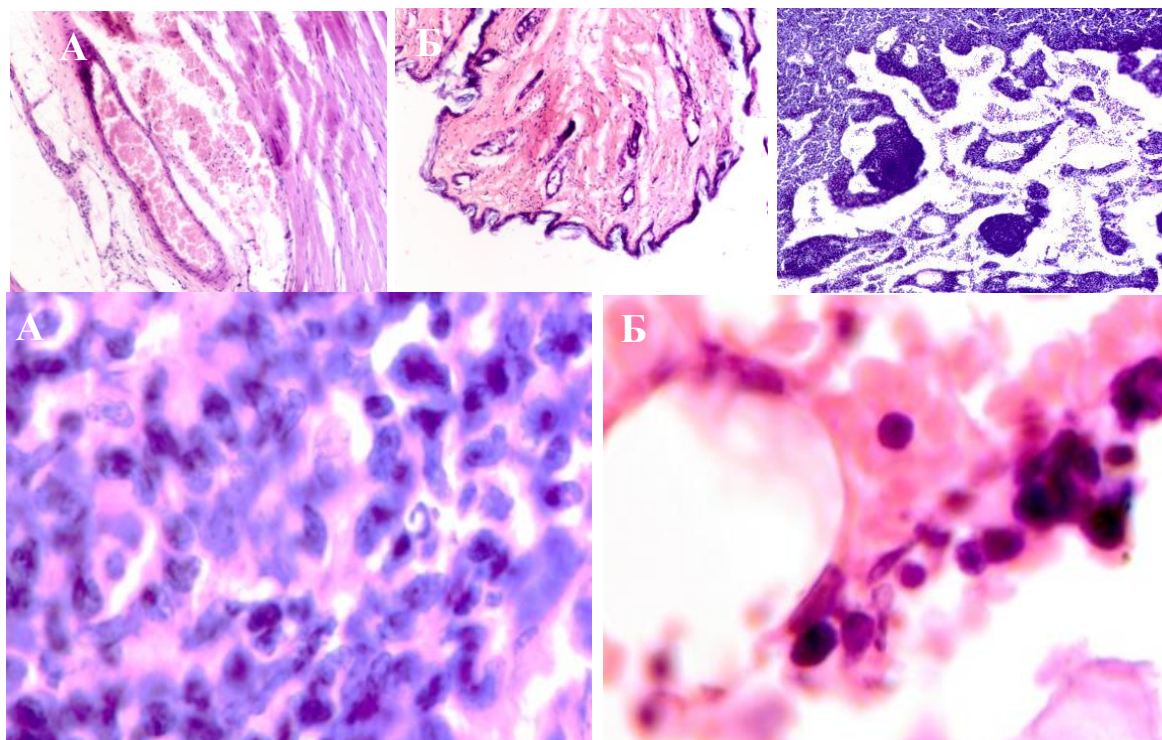


Рис. 91. Срезы тканевых структур контрольных мышей: **а** – интактная венула на границе с мышечной тканью; **б** – эпидермис мышцы с кожной соединительной тканью; **в, г** – паракортикальная зона и паренхима лимфоидного фолликула мышцы; **д** – нормальный мышечный подкожный капилляр. Плоские эндотелиоциты в стенках сосудов не выявлены. Окрашивание гематоксилином и эозином, 200× (**а-в**), 400× (**г, д**)

Кровеносные сосуды различного диаметра с гипертрофией эндотелиоцитов, гибелью и разрушением базальной мембраны были обнаружены на 2, 3-й и поздние дни. Цитоплазма эндотелиоцитов набухает в просвет эндотелия со стороны сосуда, прилегающего к месту инъекции НЧ (рис. 92, б-г). На 2-й день золотые НЧ были в основном свободны, а позже лейкоциты, окружающие очаг загрязнения, начали постепенно фагоцитозировать их. Уровни НЧ в цитоплазме макрофагов увеличивались от одиночного НЧ через 2–3 дня после инъекции (рис. 92, г, д) до полного заполнения цитоплазмы НЧ на 4-й день.

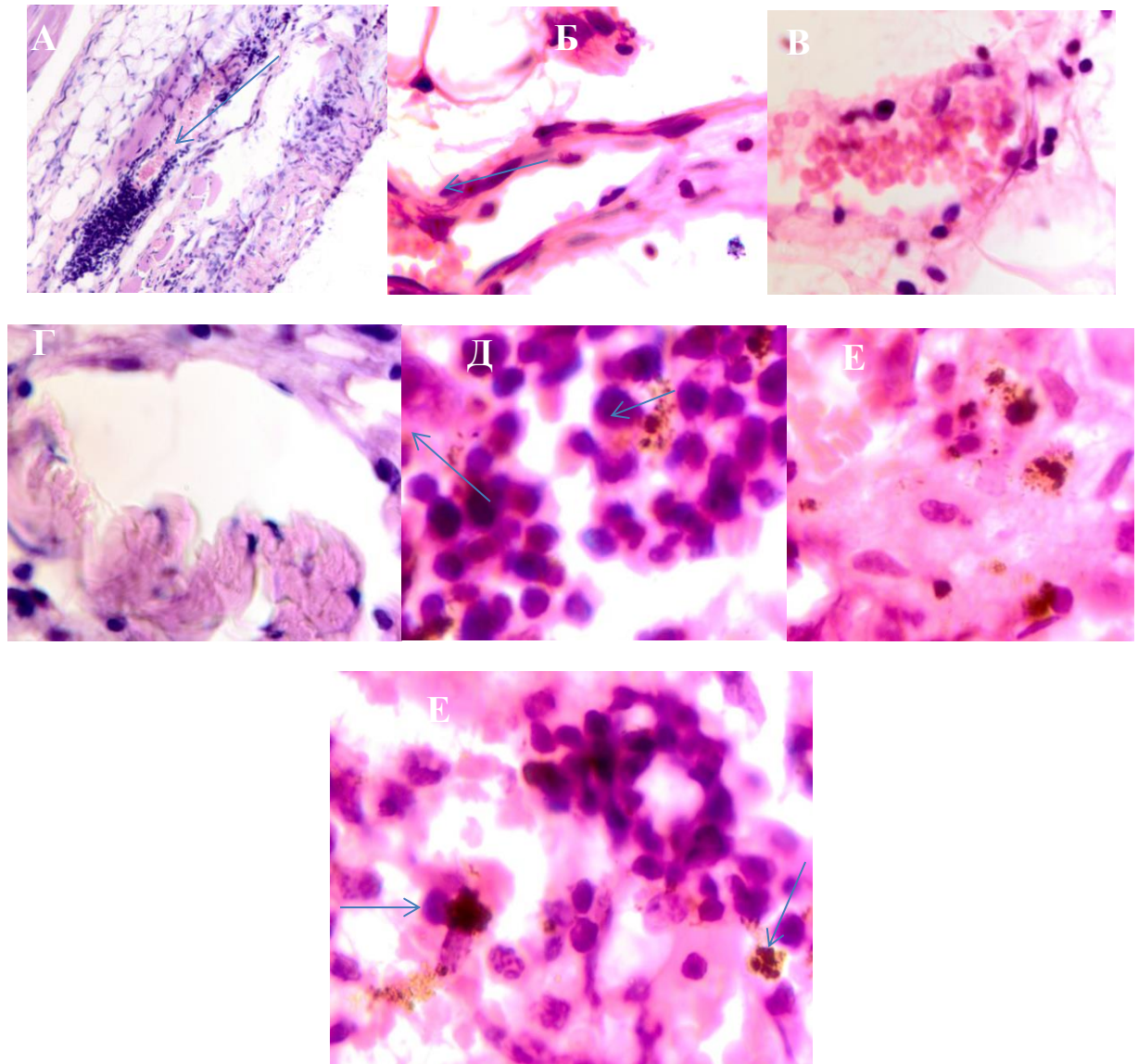


Рис. 92. Срезы эндотелия и макрофаги мышцы в месте инъекции наночастиц золота. Окрашивание гематоксилином и эозином, 400×: **а** – периартериальная лейкоцитарная инфильтрация соединительной ткани в месте введения наночастиц золота; **б** – эндотелиальная гипертрофия (*стрелки*); **в** – гипертрофия эндотелия и разрушение базальной мембраны эндотелиоцитов; **г** – активный макрофаг с введенным наночастиц золота; **д** – одиночные макрофаги с фагоцитозом наночастиц; **е** – свободные наночастицы и наночастицы, фагоцитируемые макрофагами

Свободные НЧ и НЧ, загрязняющие и заполняющие всю цитоплазму лейкоцитов (рис. 92, е) и макрофагов (рис. 92, е), были обнаружены на 4-й день. Высвобождение лизосом макрофагами (рис. 92, д) и миграция лейкоцитов к кровеносным сосудам (рис. 93, а-в) были замечены в ткани, смежной с НЧ.

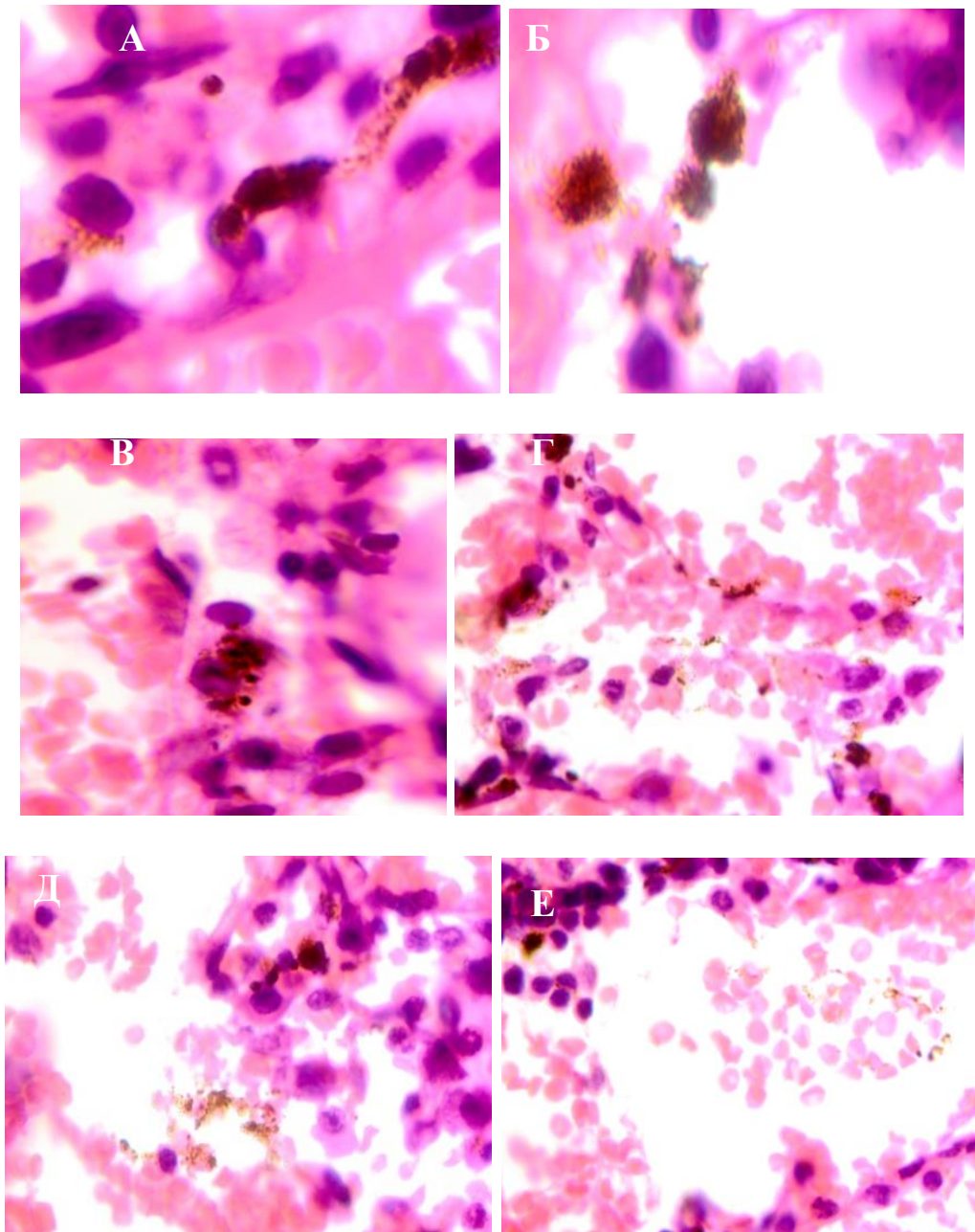


Рис. 93. Срезы макрофагов в сосудистой стенке (а-в), в просвете сосудов (г-д); свободный золотой НЧ среди эритроцитов в просвете сосудов (е). Окрашивание гематоксилином и эозином, 400×

На 4–5-й дни большая часть макрофагов была идентифицирована около стенок сосудов и мигрировала через них. Некоторые макрофаги погибли в сосудах, а в кровь высвобождалась золотая нить (рис. 93, г-е). Другим способом высвобождения НЧ в просвете сосудов была дегрануляция.

Некоторые макрофаги, нагруженные НЧ золота, мигрировали в лимфоидную фолликулярную ткань, по-видимому, для презентации антигена НЧ и активации

пула Т-клеток в направлении бластной трансформации дифференцировки иммунных клеток для реализации клеточных иммунных реакций. Кроме того, мы наблюдали высвобождение не только лейкоцитарных, но и пулов эритроцитов после введения НЧ золота (Dowling et al., 2010; Злобина и др., 2011).

Таким образом, динамика миграции НЧ золота после подкожной инъекции мышам была следующей. На 2-й день после инъекции НЧ золота фагоцитировали в интерстициальной ткани, предположительно, двумя типами макрофагов: моноцитами и Т-клетками. Моноцитарные фагоциты доставляли НЧ в кровеносные сосуды и высвобождали их в кровь в результате гибели клеток и разрыва мембран; Т-клетки доставляли НЧ в лимфоидную ткань лимфатического узла для презентации антигена и индукции бласт-трансформации эффекторных клеток трансплантационного иммунитета.

На 2-й день число интернализированных НЧ в макрофагах и количество фагоцитов, мигрирующих к кровеносным сосудам, увеличилось. Эндотелий сосудов был гипертрофирован, гипертрофия развивалась не по всей поверхности внутренней сосудистой стенки, а только в зоне, прилегающей к месту инъекции НП; гипертрофия привела к гибели эндотелиоцитов.

На 2 и 3-й дни макрофаги мигрировали в двух направлениях: к кровеносным сосудам и к Т-зависимым зонам на периферии лимфоидного фолликула для представления антигена. На 4-й день были обнаружены макрофаги, мигрирующие в просвет сосудов, их цитоплазма была переполнена НЧ. Два механизма выпуска НЧ в просвет сосудов различался: одна группа макрофагов высвобождала НЧ посредством дегрануляции, а другая – в результате смерти.

Многие исследователи объясняют наличие многочисленных макрофагов в местах инъекции НП ингибирующей ролью макрофагов в ангиогенезе посредством модификации продукции VEGF (фактор роста эпителия сосудов) и последующего разрушения сосудов (Balogh et al., 2007). Как и Chithrani (2010), мы наблюдали эндотелиальную гипертрофию в капиллярах соединительной ткани в местах инъекции НЧ.

Макрофаги интернализуют НЧ, что приводит к ингибированию их синтетической активности. Мы также наблюдали не только отдаленное влияние макрофагов на эндотелий капилляров и контактное разрушение эндотелиоцитов при прохождении НЧ-нагруженного макрофага через сосудистую стенку.

Наши результаты показали, что золотые НЧ были идентифицированы среди эритроцитов после их выделения макрофагом в просвет капилляра, но форма и размер НЧ были изменены после фагоцитоза. Это свидетельствует о ферментативной обработке НЧ в макрофаги, но это предположение требует дополнительных исследований. Согласно нашим исследованиям, макрофаги, содержащие НЧ золота в цитоплазме, мигрировали через сосудистую стенку, но не сами частицы.

Данные о динамике миграции НЧ золота из места введения в просвет капилляра имеют большое значение для разработки диагностических и лечебных мероприятий. Диагностические и лечебные мероприятия при лечении опухоли следует проводить на 2-й день после местной подкожной инъекции НЧ золота, так как на 3-й день большая его часть фагоцитируется и мигрирует в разных направлениях от фокуса, а эффективность лечения будет ниже в более поздние периоды после инъекции. Следовательно, наши данные подтверждают, что фагоцитарные эффекторные клетки, нагруженные НЧ золота, разрушают сосудистую стенку, что приводит к увеличению ее проницаемости из-за гибели эндотелия. Предположительно, механизм ингибирования продукции VEGF (фактор роста эпителия сосудов) и отсутствие ангиогенеза в опухоли обусловлены дезактивацией VEGF-продуцирующих макрофагов в результате фагоцитоза большого числа НЧ.

Глава 6. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ, СИНТЕТИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

6.1. Воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц на одноклеточные организмы

Мы исследовали влияние минеральных синтетических наночастиц на организмы из группы продуцентов: типичные представители фитопланктона Японского моря (*Attheya ussuriensis*, *Heterosigma akashiwo*, *Chaetoceros muelleri*, *Porphyridium purpureum*). Так как продуценты являются первым звеном в любой пищевой цепи, нашей задачей было оценить экологическое влияние на них различных видов наноматериалов с возможным ранжированием этого влияния.

Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC₆ снижается на 50 % (EC₅₀) в сравнении с контролем. Величины EC₅₀, полученные на основе данных проточной цитометрии и рассчитанные в программном пакете GraphPad Prism 7.04, представлены в табл. 40–43). Результаты теста на ингибирование роста водорослей *H. akashiwo* показали, что острая токсичность всех образцов зависела от дозы (рис. 94).

Таблица 40

Результаты биоиспытаний минеральных синтетических наночастиц на микроводорослях *A. ussuriensis*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
КНТ-1	–	> 1000	180,1 (173,2–189,1)	–	~839	–	97,4. (85,2–111,7)
КНТ-2	–	–	95,3 (94,7–95,9)	Увеличение на 13–22 %**	~403	176,4 (169,3–183,9)	Увеличение на 5–25 %**

* Здесь и в табл. 40–43 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

** Здесь и в табл. 40–43 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC₆, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.

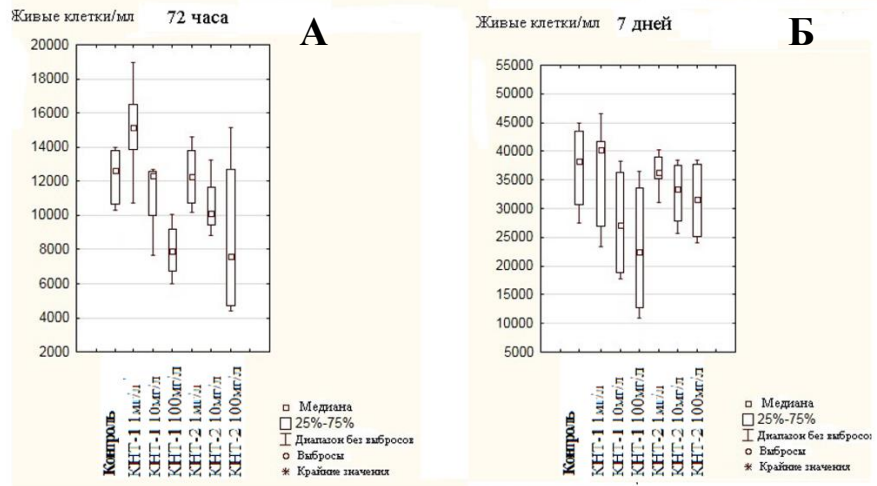


Рис. 94. Выживание морских микроводорослей *H. akashiwo* в течение 72 ч (А) и 7 дней (Б) при воздействии различных концентраций кремниевых нанотрубок (КНТ), при 20 °С и 12 : 12 ч светло-темный цикл

КНТ показали высокую токсичность для микроводорослей и отсутствие клеток с аномальной формой (рис. 95).

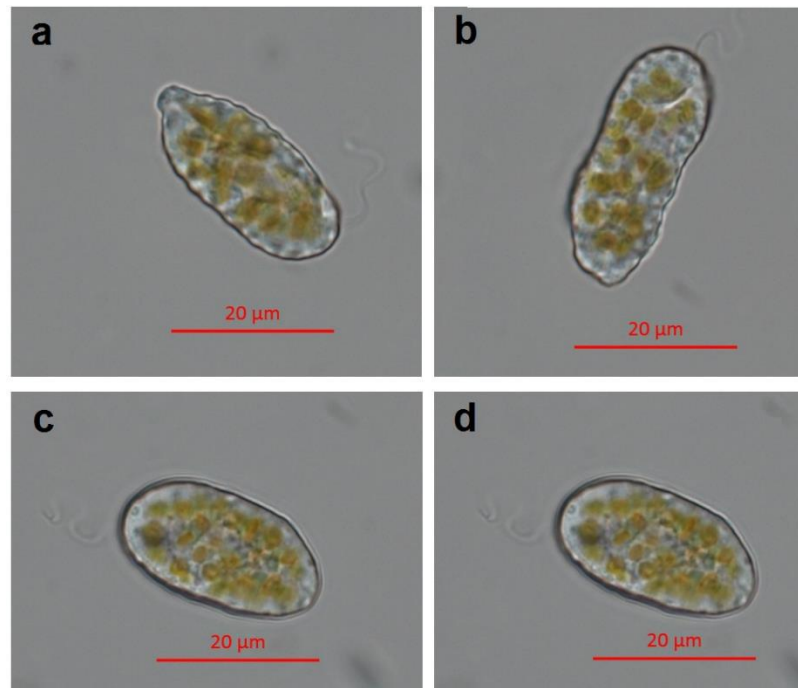


Рис. 95. Конфокальная микроскопия морских микроводорослей *H. akashiwo* с двумя образцами кремниевых нанотрубок КНТ-1 и КНТ-2 образца после 7 дней эксперимента при экспозиции 100 мг/л: **a, b** – КНТ-1; **c, d** – КНТ-2

Влияние минеральных синтетических наночастиц на флуоресценцию хлорофилла *a* 4 видов микроводорослей представлено на рис. 96 (за 100 % принято измерение группы контроля для каждого вида водорослей).

Таблица 41

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *H. akashiwo*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
КНТ-1	133,5 (127,1–140,3)	> 1000	199,1 (190,6–208,2)	~532	153,9 (148,6–159,5)	256,6 (245,4–268,6)	Увеличение на 9–15 %**
КНТ-2	45,7 (44,1–47,5)	~577,5	57,3 (56,7–57,9)	~1000	193,1 (181,8–205,5)	92,2 (88,6–96,0)	> 1000

Для микроводоросли *A. ussuriensis* КНТ-1, КНТ-2, показали снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла для данного вида.

Таблица 42

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
КНТ-1	~844	161,4 (158,6–164,3)	59,8 (58,3–61,4)	> 1000	–	132,6 (127,4–138,1)	159,7 (157,6–161,8)
КНВ-2	~373	151,8 (147,9–155,9)	61,1 (58,3–64,1)	107,7 (104,7–110,9)	142,3 (140,8–143,8)	27,9 (27,7–28,2)	74,11 (73,4–74,9)

У *H. akashiwo*, КНТ-1, КНТ-2, вызвали увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a*. У *C. muelleri* КНТ-1, КНТ-2 не приводили к изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла при концентрации 100 мг/л. Для *P. purpureum* КНТ-1, КНТ-2 не приводили к изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла при концентрации 100 мг/л.

Таблица 43

Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

Твердые частицы	Выживаемость, EC ₅₀ * (мг/л)			Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC ₅₀ * (мг/л)		Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC ₆), EC ₅₀ * (мг/л)	
	24 ч	96 ч	7 сут	3 ч	24 ч	6 ч	24 ч
КНТ-1	78,3 (76,9–79,5)	160,4 (189,7–161,1)	140,5 (137,5–143,7)	Увеличение на 10–22 %**	–	Увеличение на 42–45 %**	231,4 (229,7–233,1)
КНТ-2	131,3 (128,6–134,1)	285,2 (279,2–291,4)	170,3 (166,8–173,8)	–	280,9 (280,2–281,7)	Увеличение на 82–90 %**	148 (110,4–156,1)

Изменение размера клеток водорослей при воздействии исследуемых видов наночастиц представлено на рис. 97.

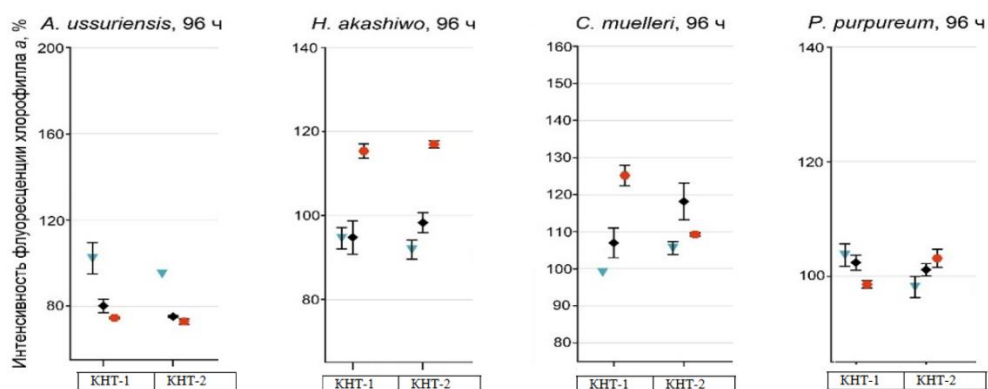


Рис. 96. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* четырех видов морских микроводорослей при воздействии исследуемых наночастиц (96 ч*). * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (символом отмечено значение медианы, границы доверительного интервала показаны на графиках)

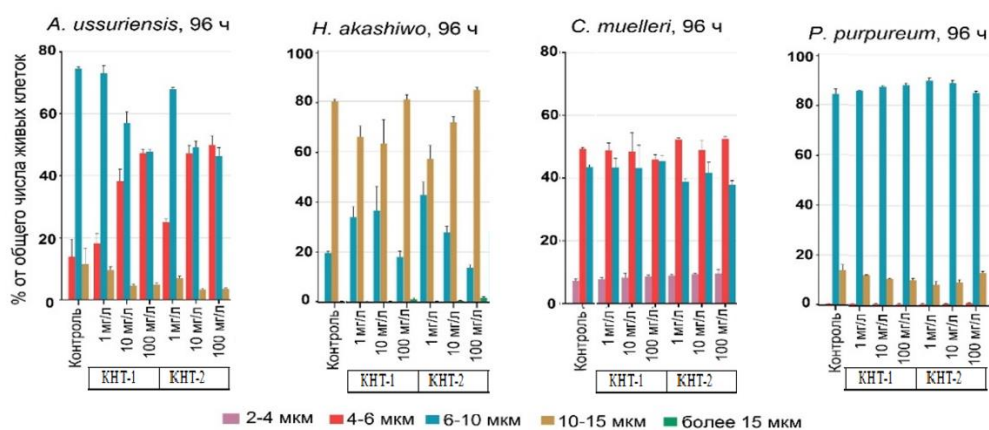


Рис. 97. Изменение размера клеток четырех видов морских микроводорослей при воздействии наночастиц (96 ч*). * Погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала показаны на диаграммах)

6.2. Воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц на беспозвоночных

Мы исследовали влияние минеральных наночастиц на разные организмы:

- иглокожие (морской еж *Strongylocentrotus intermedius*);
- двустворчатых моллюсков (*Modiolus modiolus*, *Crenomytilus grayanus*, *Arca boucardi*);
- членистоногие (*Alloperla deminuta*);

Влияние минеральных синтетических наночастиц на личинки морского ежа

Для оценки воздействия на развитие эмбрионов морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1864) нами были выбраны два типа минеральных синтетических наночастиц. В биоиспытаниях были протестированы типа кремниевых нанотрубок (КНТ-1, КНТ-2).

При оценке оплодотворяющей способности спермиев морского ежа *S. intermedius* после воздействия наночастиц, только образцы КНТ-2 ингибировали активность спермиев при концентрациях 500 и 1000 мкг/мл. Для сравнения уровня токсичности всех исследуемых образцов наночастиц были рассчитаны концентрации ЕС50, при которых оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа снижается на 50 % и происходит гибель 50 % эмбрионов в сравнении с контролем (табл. 44). Динамика нарушения развития и гибель яйцеклеток при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/мл показаны на (рис. 98).

При оценке влияния наночастиц на оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* отмечено, что наиболее существенное влияние на формирование оболочки оплодотворения оказал образец КНТ-2. Гибель оплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* отмечена при воздействии образцов КНТ-1 и КНТ-2.

Таблица 44

Средние расчетные концентрации (ЕС₅₀) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

Образец наночастиц	Оплодотворяемость яйцеклеток, ЕС ₅₀ , мкг/мл*	Гибель эмбрионов, ЕС ₅₀ , мкг/мл				
		2 ч*	4 ч*	6 ч**	24 ч***	48 ч***

КНТ-1	> 1000	48,1 (15–165)	42,2 (13–139)	37,9 (12–125)	17,5 (1–111)	8,4 (0,1–65)
КНТ-2	144,8 (72–376)	80,2 (36–207)	66,3 (27–187)	58,2 (22–167)	22,5 (1–289)	6,0 (4–130)

Примечание. В скобках приведены значения EC_{50} с доверительной вероятностью 95 %; * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,05$.

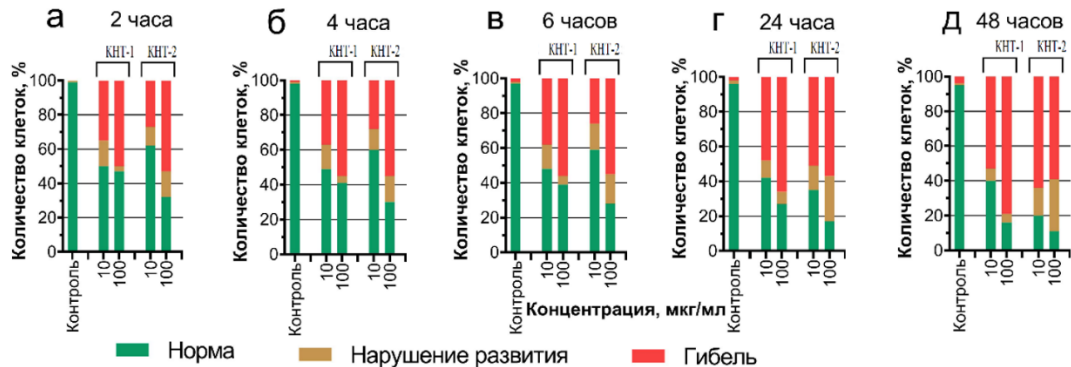


Рис. 98. Гибель и нарушение развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius* при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/л: а — 2 ч; б — 4 ч; в — 6 ч; г — 24 ч; д — 48 ч

Воздействие минеральных синтетических наночастиц на гемоциты морских моллюсков

Цитотоксичность

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия минеральных НЧ представлены на рис. 48, стр.144. В целом гемоциты *M. modiolus* были чувствительны к обоим типам минеральных синтетических наночастиц. Только *M. modiolus* показал токсичность КНТ-1 после 6 ч воздействия (рис. 48, h, стр. 144).

Изменения мембранной поляризации

Влияние НЧ на мембранную поляризацию гемоцитов *S. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* представлено в виде тепловой карты (рис. 49, стр. 145). Средняя интенсивность флуоресценции DiOC₆, прикрепленной к клеткам контрольной группы, была принята за 100 %. Для большинства протестированных НЧ

мы можем заметить зависимость от дозы деполяризацию мембраны. Чувствительность и реакция различались между видами, и в некоторых случаях можно было наблюдать даже гиперполяризацию. Наибольшая деполяризация мембраны под влиянием всех образцов НЧ была продемонстрирована гемоцитами *M. modiolus* в концентрации 1000 мг/л.

Кремниевые нанотрубки КНТ-1 вызывали наибольшую мембранную деполяризацию гемоцитов *C. grayanus* и *M. modiolus*. В то же время *A. boucardi* ответил гиперполяризацией мембран гемоцитов под влиянием образца КНТ-1 и не продемонстрировал ответа на влияние образца КНТ-2. Гемоциты *M. modiolus*, подвергшиеся воздействию КНТ-1 представлены на рис. 99.

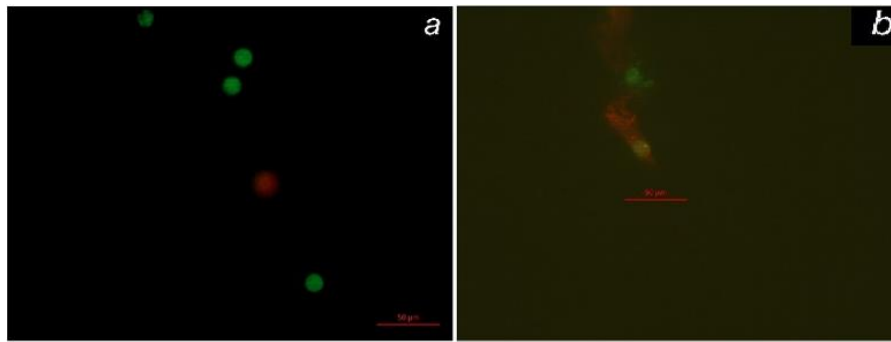


Рис. 99. Клетки гемоцитов моллюска *M. modiolus* через 6 ч воздействия НЧ в концентрации 1000 мг/л: **a** – контроль; **b** –КНТ-1

Влияние минеральных наночастиц на беспозвоночных типа членистоногих

Изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) два вида минеральных синтетических наночастиц: КНТ-1 и КНТ-2 в концентрации: 100 мг/мл. При изучении тканей пищеварительной систем *Alloperla deminuta* не выявлено видимых патологических изменений в контрольной группе. Стенки кишечника выстланы одним слоем цилиндрического эпителия в просвете кишечника имеется разнородное содержимое разных цветов (рис. 100, а), форм и размеров. В экспериментальных группах (КНТ-1 и КНТ-2) *Alloperla deminuta* также не имела видимых повреждений и имела гистологическое строение, не отличающееся от контрольной группы. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях пищеварительной систем обнаружено не было. Кишечная стенка была точно так же выстлана

одним слоем цилиндрического эпителия, как и в группе Контроль. В просвете кишечника имеется разнородное содержимое.

В группах КНТ-1 и КНТ-2 в просвете кишечника обнаружены конгломераты наночастиц меньшего размера желто-коричневого цвета, покрытые слизью (рис. 100, б). Подобные конгломераты наночастиц также редко встречались и на поверхности хитиновой оболочки насекомых во всех группах. Проведенная морфометрия клеток кишечного эпителия (площадь, длина, ширина, периметр) не выявила статистически значимых различий во всех экспериментальных группах. Хотя достоверных отличий нет, но на разные типы наночастиц прослеживаются отличные реакции клеток кишечного эпителия, как показано на рис. 101. На кремневые наночастицы реакция практически отсутствует (рис. 101). Эти данные подтверждают ранее полученные результаты о низкой чувствительности пресноводных насекомых к загрязнению наночастицами. Обнаруженные в просвете кишечника конгломераты в группах КНТ-1 и КНТ-2 были исследованы с помощью рамановской спектроскопии для подтверждения того, что это наночастицы. Однако мы столкнулись с трудностями в обнаружении КНЧ, поскольку срезы насекомых находились на стеклянной подложке.

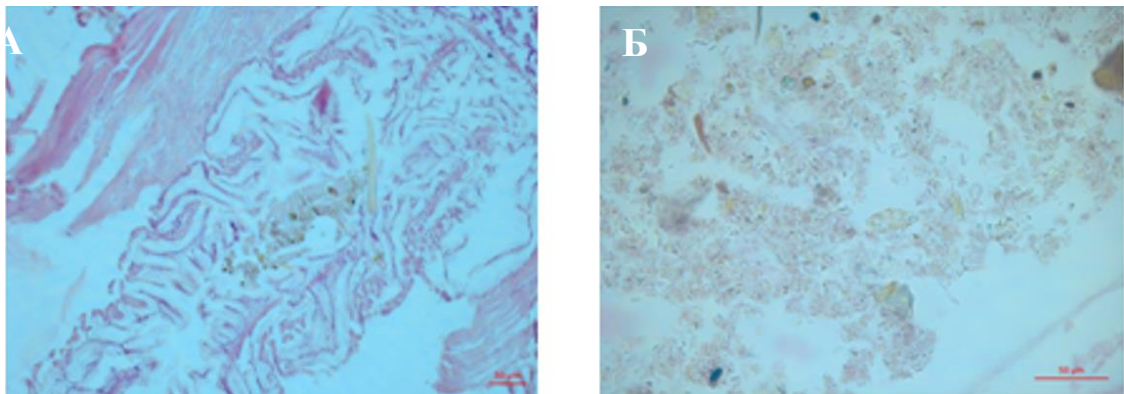


Рис. 100. Продольный срез стенки кишечника у личинок *Allogasteria deminuta* у представителей контрольной группы (а) экспериментальной группы, (б) подвергнутой воздействию КНТ-1

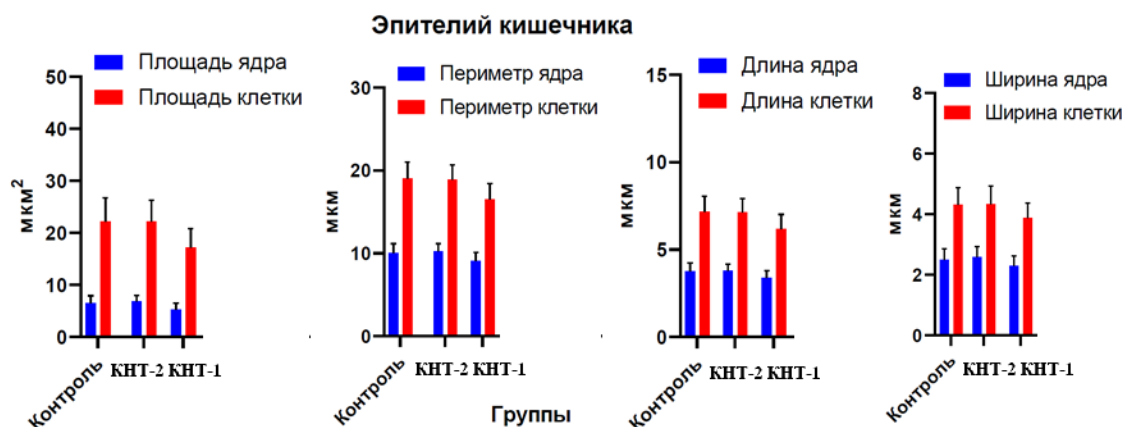


Рис. 101. Влияние минеральных синтетических наночастиц на изменения размеров ядер и клеток кишечного эпителия

6.3. Воздействие минеральных, синтетических и природных наночастиц на млекопитающих

Морфометрия эпителия желудка и кишечника в группах животных с механическим и ультразвуковым измельчениями цеолитов не выявила достоверных изменений по сравнению с нормой. Можно лишь отметить некоторые механические повреждения ворсинок кишечника в экспериментальных группах с механическим измельчением (рис. 102).

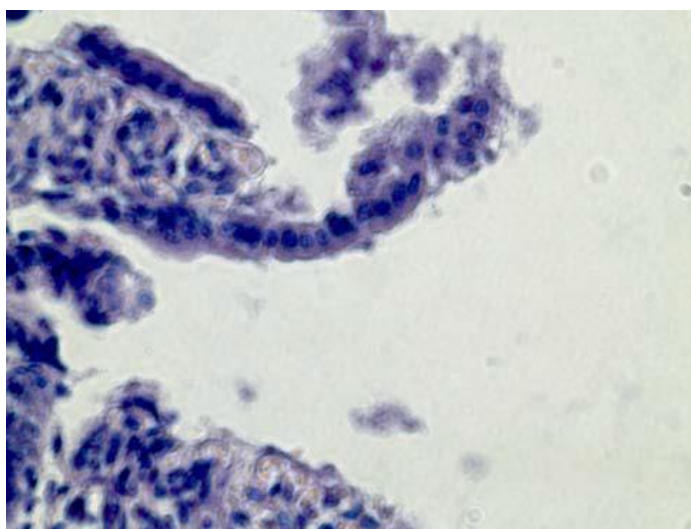


Рис. 102. Срезы стенки кишечника при введении цеолитов Чугуевского месторождения после измельчения до нанодиапозона. Видны разрывы ворсинок. Увеличение 600×

Как видно из морфометрии (табл. 45), выраженные некротические изменения в эпителии кишечника наблюдаются в группах с измельчением цеолитов Люльинского, Куликовского и Холинского месторождений в планетарной мельнице до нанодиапозона (рис. 103).

Таблица 45

Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в разных экспериментальных группах

Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²
Контроль	5,06±0,32	4,31±0,21	15,81±0,97	15,82±0,89	11,70±0,65	97,44±8,67
Шивертуй	4,56±0,27	3,49±0,33	10,72±0,74	12,09±0,94	10,12±0,85	90,02±7,59
Люльин	Некроз эпителия, не позволяющий провести достоверные морфометрические измерения					
Куликов	Некроз эпителия, не позволяющий провести достоверные морфометрические измерения					
Вангин	4,91±0,43	3,83±0,31	14,04±1,23	17,57±1,75	10,66±1,22	105,48±10,12
Холин	Некроз эпителия, не позволяющий провести достоверные морфометрические измерения					

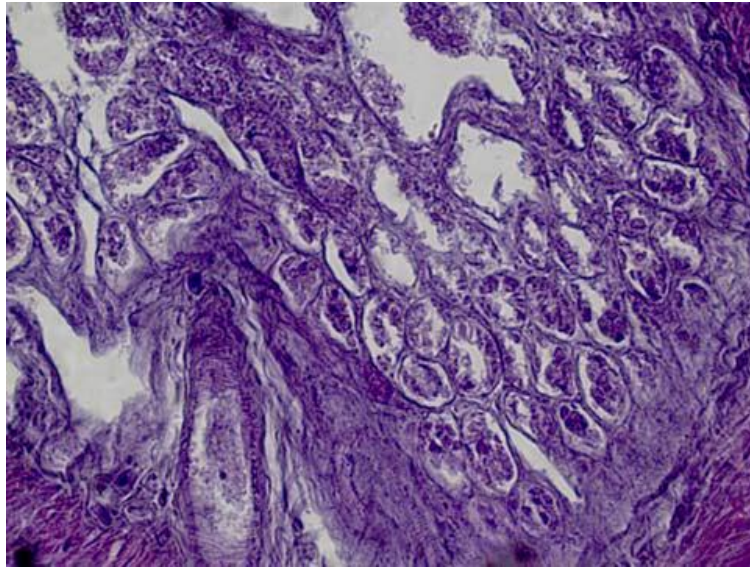


Рис. 103. Срезы слизистой кишечника при введении цеолитов Холинского месторождения после измельчения до нанодиапозона. Видны некротические изменения ткани. Увеличение 300×

Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах приведены в табл. 46.

Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в разных экспериментальных группах

Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²
Контроль	4,89±0,44	4,09±0,32	14,93±1,23	15,36±1,09	10,21±1,03	100,25±10,03
Шивертуй-н	3,77±0,35	3,24±0,22	8,92±1,03	12,82±0,94	10,78±0,85	98,05±8,94
Люльин-н	5,00±0,43	3,96±0,35	14,03±0,95	10,62±0,92	9,09±0,85	70,03±7,31
Куликов-н	3,42±0,25	2,61±0,21	6,08±0,58	11,32±1,05	8,79±0,92	70,78±6,82
Вангин-н	5,50±0,47	4,10±0,38	16,02±1,14	15,49±1,21	11,80±1,13	126,22±11,12
Холин-н	4,04±0,34	3,75±0,32	12,18±1,03	13,03±1,08	10,84±1,24	104,01±10,04

Как мы видим из данных табл. 45, особых различий по влиянию на морфологию клеток желудка между воздействием минеральных наночастиц нет. В случае же эпителиоцитов кишечника, напротив, мы можем отметить выраженное токсическое воздействие наночастиц минералов.

Влияние природных наночастиц (цеолитов) при внутримышечном введении на мышей

У интактных животных контрольной группы (без введения частиц цеолитов) в исследованных органах не наблюдали патологических изменений структуры. В группе животных, которые получали внутримышечные инъекции частиц цеолитов, в области введения отмечали деструкцию мышечных волокон, скопления лимфоцитов и макрофагов, свидетельствующие о некрозе мышечной ткани и развитии воспалительного процесса (рис. 104, а). Наблюдали макрофаги с большим количеством лизосом с частицами цеолитов в цитоплазме (рис. 104, б).

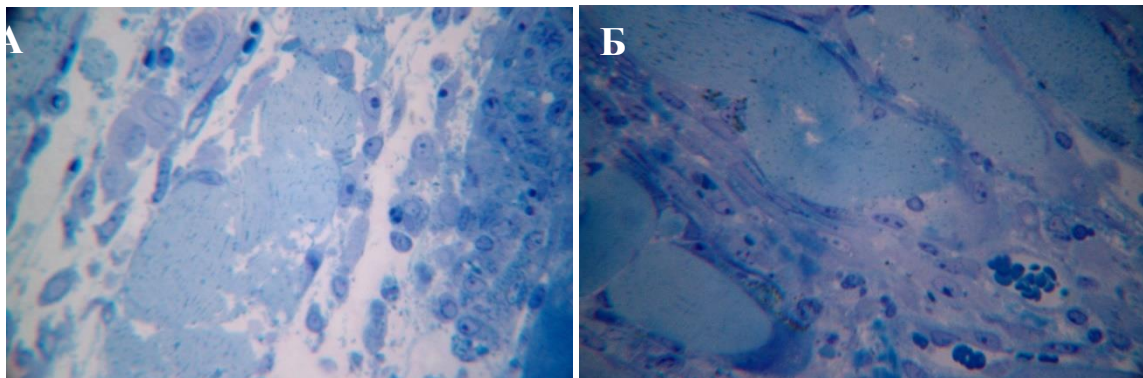


Рис. 104. Срезы мышечных волокон с деструкцией, повышенное содержание лимфоцитов и макрофагов (а), наличие макрофагов с увеличенным содержанием лизосом с частицами цеолитов (б) в мышечной ткани бедра мыши при введении частиц цеолитов Вангинского месторождения. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 400×

В печени животных, которым вводились цеолиты, наблюдали гепатоциты со средне- и крупнокапельной вакуольной дистрофией токсического генеза (рис. 105, а). Отмечали стаз эритроцитов в синусоидах и крупных сосудах печени (рис. 105, б). В структуре почек экспериментальных животных, которым вводился цеолит, наблюдали полнокровие сосудов, небольшие периваскулярные кровоизлияния и незначительную инфильтрацию клеток крови. В цитоплазме эпителиоцитов проксимального отдела нефрона отмечали многочисленные включения (наночастицы цеолита). Стоит отметить также отечные и застойные явления в структуре почки, из-за чего практически не определялись просветы проксиальных и дистальных канальцев. Эпителий канальцев местами был некротизирован (рис. 106).

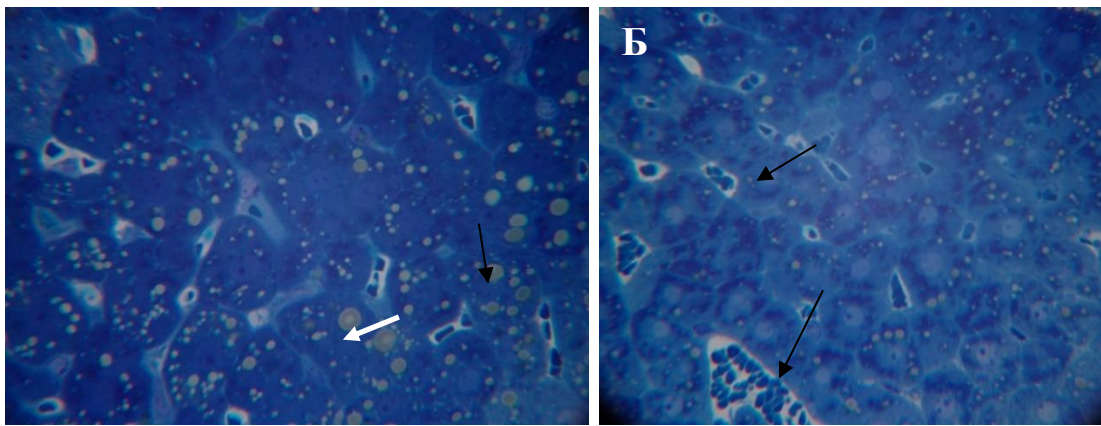


Рис. 105. Срезы ткани печени, липидная инфильтрация (а – отмечено стрелками) и стаз эритроцитов в синусоидах печени мыши (б – отмечено стрелками) при введении частиц цеолитов Вангинского месторождения. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 400×

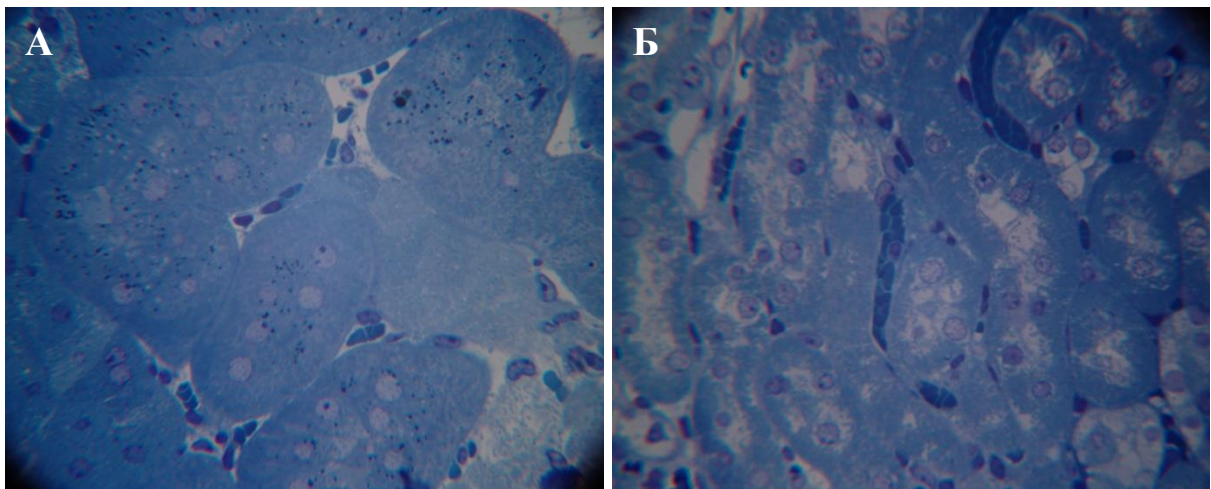


Рис. 106. Срезы ткани почки мыши при введении частиц цеолитов Вангинского месторождения. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 400×

В паховых лимфатических узлах животных, которым вводили цеолит, отмечали повышенное содержание макрофагов (рис. 107, а). При этом размеры краевого и мозговых синусов были увеличены (рис. 107, б).

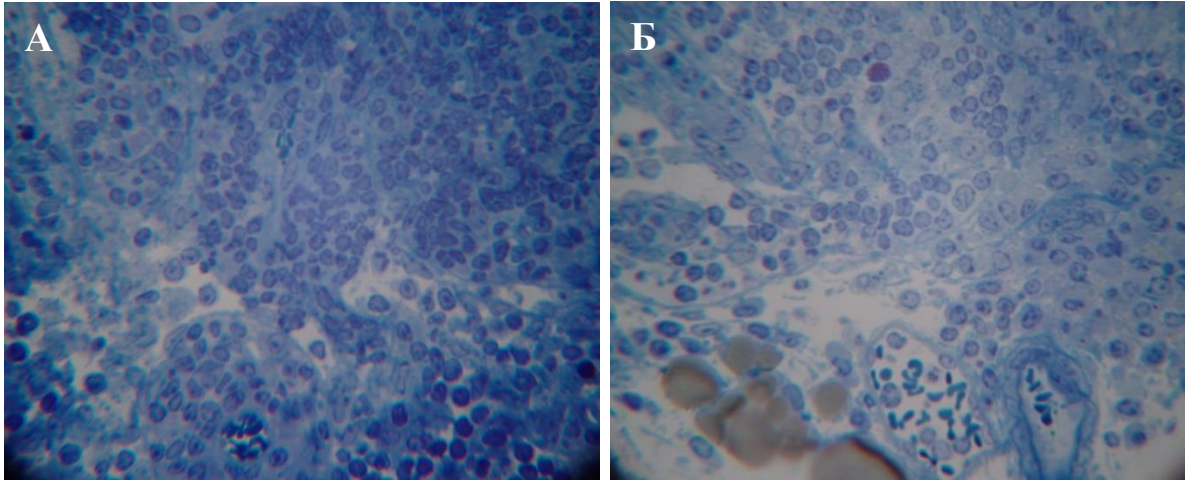


Рис. 107. Срезы ткани пахового лимфатического узла мыши при введении частиц цеолитов Вангинского месторождения: **а** – повышенное содержание макрофагов; **б** – расширенные просветы мозговых синусов лимфатического узла. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 400×

Исследование структуры легкого выявило наличие стаза эритроцитов в кровеносных капиллярах легочных альвеол и тромбоз сосудов легкого (рис. 108).

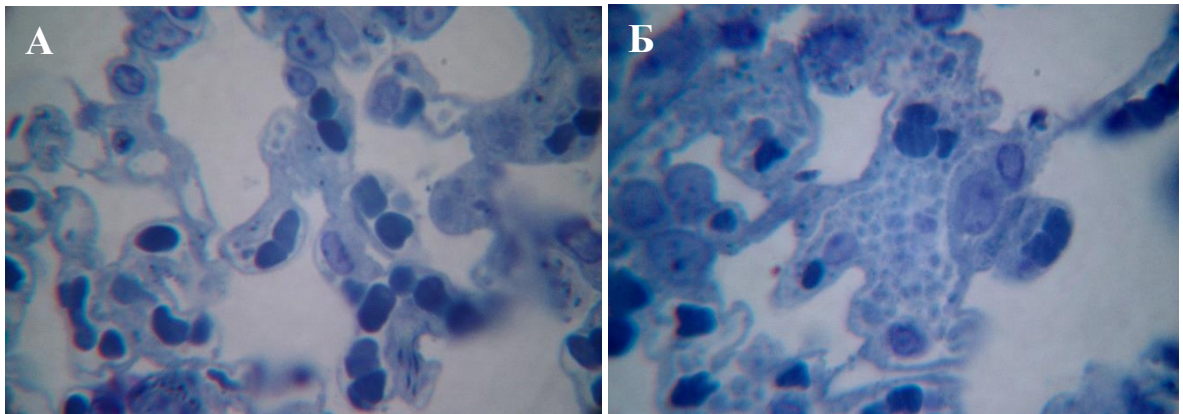


Рис. 108. Срезы ткани легких. Стаз эритроцитов в кровеносных капиллярах легочных альвеол (**а**) и тромбоз сосудов легкого (**б**) при введении частиц цеолитов Вангинского месторождения. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 900×

Глава 7. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОРГАНИЗМЫ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ОРГАНИЗАЦИИ И РЕКОМЕНДАЦИИ К ИЗМЕНЕНИЮ СУЩЕСТВУЮЩИХ НОРМ И МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ, ОХРАНЫ СРЕДЫ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ

7.1. Повреждающее действие наночастиц на клеточном уровне и устойчивость одноклеточных организмов

Диапазон концентраций воздействия для наших исследований был выбран в соответствии с ранее опубликованными данными. Уровни концентрации воздействия наночастиц для пресноводных водорослей варьировались от 0,1 до 60,0 мг/л (Aruoja et al., 2015), пресноводные зеленые водоросли подвергались воздействию отожженных многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) на уровнях от 5 до 30 мг/л (Figarol et al., 2015) и материалов семейства графенов на уровнях в диапазоне от 37 до 180 мг/л; морские водоросли подвергались воздействию МУНТ на уровне от 0,1 до 10,0 мг/л. Мы выбрали несколько более высокие концентрации МУНТ для *Heterosigma akashiwo*, чем уровни, используемые для морских водорослей *Dunaliella tertiolecta*, поскольку последний способен выделять активные формы кислорода (перекись водорода и супероксид), которые значительно увеличивают его устойчивость к загрязнению и стрессу (Twiner et al., 2001).

Микроскопическая водоросль *H. akashiwo* (класс *Raphidophyceae*) была выбрана потому, что важно проанализировать токсичность углеродных наноматериалов в отношении локальных морских микроводорослей Дальнего Востока России, кроме того, этот вид имеет тонкую клеточную стенку, что может сделать его довольно восприимчивым к химическому загрязнению.

Известно, что ингибирование роста тесно связано с затенением УНТ и агрегацией клеток водорослей. Мы не заметили прямой связи между затенением и торможением роста, но в случае нановолокон мы наблюдали, как они агрегировались с ними и образовывали большие кластеры. Результаты теста на ингибирование роста водорослей выявили хорошую корреляцию с количеством G-полос, ко-

торое представляет количество правильно сформированных нанотрубок в образцах. Вероятно, большое количество правильно сформированных нанотрубок влияет на жизнеспособность популяций микроводорослей. Образец МУНТ-2.2 проявлял бóльшую ингибирующую активность в отношении роста водорослей, чем МУНТ-2.1. Что касается образцов УНВ, то образец с большим количеством примесей Ni, УНВ-1.2, показал бóльшую ингибирующую активность, чем УНВ-1.1. Вероятно, это различие связано с тем, что в образцах УНТ большая часть металлических примесей находится внутри трубок и недоступна для водорослей. Известно, что металлы, такие как частицы Ti, Ni, Cu, Zn, Cr и редкоземельные оксиды, ингибируют рост водорослей и вызывают прямые и косвенные токсические эффекты (Miazek et al., 2015). Важность металлических примесей для токсического воздействия углеродных нанотрубок была показана ранее (Vitkina et al., 2016). Более того, ранее было показано, что Ni приводит к нарушению формы клеток микроводорослей. Образцы УНВ, напротив, имеют небольшое количество связей типа графена, но все примеси находятся на поверхности и легко доступны. Вероятно, в случае УНВ ингибирующий эффект вызван только примесями. Понимание механистических взаимодействий наночастиц с внеклеточным матриксом очень важно для нанотоксикологии (Engin et al., 2017).

Кремниевые нанотрубки показали высокую острую токсичность, хотя ранее считалось, что сам оксид кремния нетоксичен для микроводорослей. Отсутствие водорослей неправильной формы в эксперименте с КНТ означает, что физическое повреждение остается основным предположением о причине смерти. Вполне вероятно, что токсичность кремниевых нанотрубок напрямую связана с их структурой и тем фактом, что они наносят физический ущерб целостности клеток. Оба образца МУНТ имеют длину, в сотни раз превышающую диаметр, и вероятность физического повреждения не так велика, как в случае кремниевых нанотрубок.

Мы предполагаем, что большая токсичность КНТ по сравнению с МУНТ обусловлена тем, что они меньше и более гидрофильны. Оба эти фактора увеличивают их проникновение и скорость перемещения в растворе. В случае КНТ образец не содержит большого количества примесей, поэтому не было никаких оснований для

обнаружения измененных форм клеток. Наконец, это исследование показало, что углеродные и кремниевые нанотрубки в концентрациях 100 мг/л проявляют как острую, так и хроническую токсичность. Из полученных результатов можно сделать вывод, что основной причиной гибели клеток среди этих образцов было механическое повреждение, которое нарушало целостность клеток.

В то же время углеродные нановолокна в концентрации 100 мг/л почти не проявляли токсичности, хотя наблюдалось значительное количество клеток неправильной формы. Следует отметить, что такие клетки неправильной формы не наблюдались в случае нанотрубок с четко определенной структурой. Это наблюдение позволяет нам сделать вывод, что появление этих нерегулярных клеток, вероятно, было связано с присутствием небольших количеств примесей в образцах УНВ, поскольку водоросли очень чувствительны к тяжелым металлам (Aruoja et al., 2015).

Чувствительность различных видов микроводорослей к наночастицам CdS и ZnS зависит от размера частиц, химического состава и их способности взаимодействовать с компонентами клеточной стенки микроводорослей. Общая токсичность протестированных наночастиц CdS и ZnS также может быть связана с их небольшим размером (соответственно 7,0 и 4,2 нм), что позволяет им проходить сквозь поры через клеточную стенку водорослей. Наночастицы ZnS были более токсичными для видов *A. ussuriensis* и *H. akashiwo*, в то время как частицы CdS вызывали сильное ингибирование скорости роста для *C. muelleri* и *P. purpureum*. Красная микроводоросль *P. purpureum* продемонстрировала высокую устойчивость к наночастицам ZnS, что можно объяснить взаимодействием ионов Zn с фикобилипротеидами красных водорослей. Устойчивость клеток *P. purpureum* к воздействию наночастиц ZnS представляет собой интересный случай для более подробных исследований в будущем. На основании наблюдений мы предложили различные механизмы токсического действия исследованных наночастиц CdS и ZnS. Следовательно, более сильное влияние нанокристаллов CdS на морфологические и биохимические изменения клеток микроводорослей было основано на более высокой фотоактивности наночастиц CdS при облучении видимым светом и их более высокой

стабильности в воде. Эти свойства позволяют наночастицам CdS генерировать больше АФК, тем самым повышая риск окислительного стресса для водных организмов. Для лучшего понимания водной токсичности наночастиц сульфида металлов в будущих исследованиях необходимо учитывать несколько дополнительных параметров, таких как интенсивность света и ультрафиолетового/видимого излучения, процессы, участвующие в образовании АФК и дальнейшем окислении, а также трансформации НЧ, и их передача между различными трофическими уровнями пищевой цепи.

Результаты нашего исследования позволяют сделать следующие выводы. МУНТ по отношению к морским микроводорослям *Pseudo-nitzschia pungens* и *Isochrysis galbana* проявляют токсичность в исследованных концентрациях. Также стоит отметить, что микроводоросли, принадлежащие к разным таксономическим группам (диатомовые и золотистые), по-разному реагируют на углеродные нанотрубки. *P. pungens* при инкубировании в присутствии МУНТ в концентрации 1 мг/мл в течение 12 ч ответила возрастанием количества клеток, а затем – снижением, вплоть до двукратного по сравнению с контрольным при культивировании 48 ч. При концентрации МУНТ 10 мг/мл отмечается резкое снижение количества клеток начиная с 24 ч инкубирования.

Isochrysis galbana практически не отреагировала на концентрацию 1 мг/мл, кроме снижения в два раза на временном отрезке 36 ч, тогда как при дальнейшем культивировании количество клеток достигло контрольных значений. Концентрация МУНТ 10 мг/мл на эти же клетки подействовала угнетающе: их число в поле зрения снижалось в два раза при инкубировании 36 и 48 ч. Разница во влиянии на разные виды микроводорослей в первую очередь обусловлена их морфологическими особенностями и особенно наружными покровами, которые и обеспечивают контакт с наноматериалами. Так, диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*) покрыты «панцирем», состоящим преимущественно из кремнезема.

Золотистые водоросли (*Crysophyta*) обычно голые, т.е. покрыты только плазмалеммой или одеты «панцирем», состоящим из кремниевых чешуек. Твердой обо-

лочкой обеих водорослей можно объяснить и тот факт, что исследованные концентрации МУНТ полностью не подавляют рост водорослей и через 48 ч, в случае с *Isochrysis galbana* наблюдается адаптация, проявляющаяся в возвращении к контрольным величинам количества клеток, их размеров и подвижности. В пользу механизма токсического действия нанотрубок через поверхностные мембранные эффекты, опосредованные системой вторичных посредников, можно привести факт отсутствия многослойных трубок внутри водорослей.

7.2. Повреждающее действие наночастиц на органно-тканевом и органно-системном уровнях и устойчивость беспозвоночных и млекопитающих

Полученные нами результаты воздействия МУНТ вполне согласуются с экспериментами, на личинках хирономид, цериодафниях, микроводоросли сценедесмус и кишечной палочке. Их препараты по результатам токсикологических тестов были отнесены к 3-му классу опасности, аналогично обычной саже. Для самого чувствительного тест-объекта, сценедесмуса, безвредная (подпороговая) концентрация составила 2 мг/л.

Определение влияния веществ на оплодотворяющую способность спермиев – достаточно быстрая процедура, поэтому ее удобно использовать как индикатор токсичности данных веществ. Несмотря на то, что в случае с химическими веществами яйцеклетки морского ежа менее чувствительны, чем спермии (Dinnel, 1995), в случае с наночастицами яйцеклетки оказались более чувствительны, в то время как на спермии оказали влияние только частицы золота и кремния КНТ-2.

Токсическое действие также наблюдали на разных стадиях эмбриогенеза оплодотворенных яйцеклеток. Видно, что цитотоксические свойства проявляются постепенно, в течение всего теста. Кроме того, необходимо отметить, что наночастицы золота, наночастицы, образованные в процессе подводной сварки и резки, наночастицы кремния КНТ-2 и углеродные нановолокна (УНВ-1.1; УНВ-1.2) не только были цитотоксичны, но и вызывали нарушения в развитии, такие как неравномерное деление и задержка циклов деления. Вероятнее всего, это связано не с

размером и свойством наночастиц, а с химическими примесями, переходящими в раствор или адсорбированными на поверхности наночастиц. Ранее нанотрубки и нановолокна были исследованы на ингибирование роста морских микроводорослей (Pikula et al., 2020). Токсикологическая модель с эмбрионами морских ежей оказалась значительно более чувствительной и более быстрой для проведения. Однако для лабораторий, расположенных вдали от моря, она по-прежнему менее удобная. Кроме того, на (Таб. 39) видно, что LD_{50} наночастиц сульфидов Zn и Cd для эмбрионов морских ежей после 48 ч экспонирования около 10 мкг/л. Однако на сам процесс оплодотворения влияют только концентрации на порядок выше.

Ранее на другой модели с морскими организмами (морскими водорослями) было показано, что концентрации LD_{50} выше 100 мкг/л (Pikula et al., 2020). В качестве механизмов репродуктивной и эмбриотоксичности наночастиц обычно рассматриваются окислительный стресс, воспаление и повреждение ДНК (Wang et al., 2018), однако применительно к использованной экспериментальной модели требуются дополнительные уточняющие исследования.

Нами было изучено влияние металлических (CdS, ZnS, TiO₂, Au), углеродных нановолокон и нанотрубок, кремниевых наночастиц КНТ-1 и КНТ-2 на развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Было показано, что наиболее токсичными для этой модели оказались наночастицы золота, наночастицы, образованные в процессе подводной сварки и резки, наночастицы кремния КНТ-2 и углеродные нановолокна (УНВ-1.1; УНВ-1.2). Было показано, что LD_{50} наночастиц сульфидов Zn и Cd для эмбрионов морских ежей после 48 ч экспонирования около 10 мкг/л. Можно заключить, что использованная экспериментальная модель, включающая исследование оплодотворения и эмбрионов морских ежей *S. intermedius*, оказалась достаточно простой и чувствительной, поэтому она может с успехом использоваться при проведении скрининговых нанотоксикологических исследований в сфере морской экологии.

Доступная литература подтвердила применимость видов двусторчатых моллюсков в качестве надежной модели для исследований как *in vivo*, так и *in vitro* в

нанотоксикологии (Canesi et al., 2012; De Marchi et al., 2019). Однако виды, выбранные в нашем исследовании, обычно не используются для оценки токсичности НЧ (Anisimova et al., 2017). В этом исследовании мы выявили различия между влиянием 10 типов НЧ на основе углерода, кремния и металлов на гемоциты трех типичных морских мидий Японского моря, а именно *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi*. Мы полагаем, что результаты этого краткосрочного биоанализа *in vitro* заложат основы для дальнейшего понимания рисков, связанных с НЧ, и послужат руководством для выбора проверенных видов для таких исследований по оценке риска в области водной нанотоксикологии.

Только гемоциты *M. modiolus* продемонстрировали цитотоксический ответ под влиянием КНТ-1 после 6 ч воздействия (рис. 48, стр. 144). Более высокая токсичность КНТ-1 по сравнению с НЧ КНТ-2 коррелирует с меньшим размером и значительно более развитой площадью поверхности. Высокая токсичность более мелких частиц с большей площадью поверхности является одним из ключевых моментов в токсикологии частиц (Fubini et al., 2010).

Анализ изменений в поляризации мембраны гемоцитов показал, что НЧ КНТ-1 оказывали более значительный эффект на мембранный заряд всех трех видов мидий по сравнению с НЧ КНТ-2. Интересно, что гемоциты *A. boucardi* реагировали зависимой от дозы мембранной гиперполяризацией, что, возможно, связано с ранней активацией нескольких путей гибели клеток. Наиболее выраженная деполяризация мембраны наблюдалась для клеток *M. modiolus*, подвергшихся воздействию КНТ-1 из-за их меньшего размера. Эти наблюдения согласуются с зарегистрированным цитотоксическим эффектом НЧ КНТ-1.

Согласно данным цитотоксичности, мы можем подчеркнуть сходство между формами кривых жизнеспособности для гемоцитов *M. modiolus*, подвергшихся воздействию углеродных нанотрубок (МУНТ-2.2 и МУНТ-2.3), и образцами кремниевых нанотрубок (КНТ-1). Эти данные свидетельствуют о сходном режиме токсического действия для углеродных и кремниевых нанотрубок, который, скорее всего, выражается в механическом воздействии частиц на клетки.

Металлсульфидные нанокристаллы, т.е. CdS и ZnS, ранее были описаны как высокотоксичные НЧ для водных организмов (Hoshino A 2011) из-за их небольшого размера, фотоактивности под видимым и ультрафиолетовым излучением и возможного выделения ими ионов токсичных металлов в результате нанокристаллической фотокоррозии в воде (Cheng L 2018). Мы зарегистрировали дозозависимую и зависящую от времени цитотоксичность НЧ CdS и ZnS по отношению к гемоцитам всех трех видов двустворчатых моллюсков. Значительное увеличение токсичности НЧ ZnS можно наблюдать при 6-часовых измерениях *C. grayanus*, *A. boucardi*. Наблюдаемый эффект, возможно, связан с меньшей стабильностью нанокристаллов Zn в воде ($\log K_{s0}$, $-26,02$) по сравнению с CdS ($\log K_{s0}$, $-31,42$), что приводит к растворимости нанокристаллов (например, больше ионов Zn^{2+} и S^{2-} может образовываться в раствор) (Benjamin, 2014). Более высокая водная токсичность ионов Zn^{2+} по сравнению с формой НЧ описана в предыдущих работах (Katsumiti et al., 2016). Кроме того, более высокая токсичность НЧ CdS и ZnS может быть обусловлена относительно меньшим размером по сравнению с другими НЧ.

Значительная мембранная деполяризация гемоцитов, подвергающихся действию наночастиц CdS и ZnS, вероятно, вызвана высокой фотоактивностью нанокристаллов сульфидов металлов (Mintcheva et al., 2019), что облегчает образование активных форм кислорода (АФК) в среде и в конечном итоге приводит к окислительной реакции и нарушению метаболизма клетки (Pikula et al., 2019). Аналогично ранее было описано, что ионы Zn_{2+} приводят к внутриклеточной генерации АФК и вызывают деполяризацию и дисфункцию митохондриальной мембраны (Bishop et al., 2007).

Несмотря на высокий уровень токсичности, зарегистрированный для НЧ CdS и ZnS, все еще остается много вопросов без ответа о корреляции между водной токсичностью НЧ и такими параметрами, как облучение светом, образование АФК и трансформация НЧ. Дальнейшие исследования необходимы для более тщательного изучения связи между характеристиками частиц и их токсическим воздействием на водные организмы.

TiO₂ НЧ используются в различных потребительских товарах и широко применяются при очистке окружающей среды (Waghmode et al., 2019). Предыдущие исследования показали, что анатазокристаллическая форма НЧ TiO₂ значительно более токсична, чем частицы рутила (Clément et al., 2013). В отличие от клеток *S. grayanus* и *A. boucardi*, гемоциты *M. modiolus* под влиянием НЧ TiO₂ реагировали мембранной гиперполяризацией. Такой ответ может быть связан с генерацией АФК фотоактивными НЧ TiO₂ (Haynes et al., 2017) и дальнейшим окислительным расстройством. Различия сохраняются и токсические эффекты этих НЧ между испытываемыми видами могут быть связаны с различиями в их системах антиоксидантной защиты, как показано ранее для нескольких двустворчатых моллюсков (Rocher et al., 2006). Гемоциты *A. boucardi* были толерантными к НЧ TiO₂ после 2 и 4 ч воздействия), но незначительный цитотоксический эффект наблюдался после 6-часовой обработки. Дальнейшее исследование должно оценить долгосрочное влияние наночастиц TiO₂ на морских двустворчатых моллюсков.

Наночастицы золота имеют многообещающее применение в медицине, биологии и химии (Alex, Tiwari, 2015). Исследования на морских двустворках *Ruditapes philippinarum* не показали кратковременную и субхроническую токсичность стабилизированных цитратом Au НЧ (Volland et al., 2015). Другое исследование продемонстрировало накопление Au НЧ у моллюсков *Mytilus edulis bivalve* и окислительный стресс, связанные с токсичностью (Tedesco et al., 2008). Результаты наших исследований продемонстрировали цитотоксическое влияние Au НЧ на гемоциты *M. modiolus* и *A. boucardi*. Интересно, что гемоциты *S. grayanus* выявили толерантность к Au НЧ, но показали значительную депольяризацию мембран. Эти наблюдения представляют интересный случай для дальнейших исследований. Мы намерены расширить это исследование путем применения показателей окислительного стресса и реализации долгосрочного воздействия.

Отсутствие какого-либо видимого цитотоксического влияния углеродных нановолокон УНВ-1.1 и УНВ-1.2 на гемоциты всех исследованных видов может быть связано с физико-химическими свойствами этих НМ. Однако дозозависимое и зависящее от времени увеличение смертности для *M. modiolus*, подверженного

воздействию углеродных нанотрубок МУНТ-2.2 и МУНТ-2.3, и увеличение смертности *A. boucardi*, подверженного воздействию МУНТ-2.3, по-видимому, связано с различиями в структуре НЧ. В то же время не было никакой корреляции между зарегистрированными токсическими эффектами и составом химических примесей в образцах. Подобное наблюдение ранее сообщалось для гемоцитов мидии *M. edulis*, подвергнутых воздействию углеродных нанотрубок и углеродных нановолокон (Barrick et al., 2019). Кроме того, более высокий токсический эффект одностенных углеродных нанотрубок по сравнению с многостенными углеродными нанотрубками наблюдался для клеток *Mytilus* sp. (Miller et al., 2015), что подтверждает более высокую токсичность более гидрофильных углеродных НЧ. В наших ранних работах с такими же образцами НЧ, протестированными на четырех видах микроводорослей (Pikula et al., 2020), показано, что гидрофобность поверхности образца и его сродство к клеточной стенке морских организмов играют ключевую роль в уровне водной токсичности углеродных НЧ. Следовательно, кажется, что чем больше гидрофильных углеродных нанотрубок МУНТ-2.2 и МУНТ-2.3, тем выше механическое повреждение клеток гемоцитов по сравнению с гидрофобными и менее упорядоченными углеродными нановолокнами УНВ-1.1 и УНВ-1.2. В частности, достоверность этого предположения можно увидеть для гемоцитов *M. modiolus*, которые оказались наиболее чувствительными к используемым тест-объектам.

Кроме того, чувствительность гемоцитов *M. modiolus*, подвергшихся воздействию НЧ, была выражена наибольшей деполяризацией мембраны по сравнению с двумя другими видами. Все протестированные образцы углеродных НЧ влияли на мембранную поляризацию гемоцитов всех используемых видов дозозависимым образом. Ранее снижение мембранного потенциала было описано как индикатор преапоптотических процессов и как маркер ранней сублетальной токсичности (Canesi et al., 2008). Толерантность клеток *C. grayanus* к воздействию тестируемыми углеродными наночастицами коррелирует с самым низким уровнем деполяризации мембраны по сравнению с двумя другими видами. Кроме того, *A. boucardi* выявила

цитотоксический ответ через 6 ч воздействия МУНТ-2.3 НЧ и демонстрировала более высокую деполяризацию мембраны при концентрациях 500 и 1000 мг/л.

Эти наблюдения позволяют нам предположить, что более длительное воздействие на гемоциты углеродными НЧ может привести к дальнейшей деполяризации мембраны и в итоге к цитотоксичности. Это важная основа для дальнейших исследований воздействия в будущем.

Мы попытались определить влияние кратковременного (24 и 48 ч) воздействия МУНТ на состояние ключевых систем, взаимодействующих с инородными частицами в двустворчатых моллюсках *Modiolus*. Чтобы оценить влияние МУНТ-2.4 на организм *Modiolus modiolus*, мы исследовали гистологическую картину жабр, кишечника, пищеварительной железы и гемолимфы как основных тканевых мишеней двустворчатых моллюсков при повышенной нагрузке на окружающую среду, включая нерастворимые ксенобиотики, конкретные наночастицы.

Известно, что наночастицы, попадающие в воду, образуют более или менее крупные агрегаты, что облегчает их захват жабрами моллюсков, по сравнению со свободно взвешенными частицами. Результаты проведенных нами кинетических исследований показали, что МУНТ, взвешенные в морской воде в концентрации 100 мг/л, интенсивно агрегируют и оседают на дно в первые часы, а через 24 ч они практически полностью отсутствуют в подвешенном состоянии. Согласно литературным данным, различные наночастицы (C_{60} , фуллерен, TiO_2 и SiO_2), взвешенные в искусственной морской воде, образуют агрегаты нано- и микро размеров. В присутствии моллюсков агрегаты, ассоциируемые со слизью, откладываются вдоль нити биссуса и оседают на дне аквариума в течение 24 ч (Canesi et al., 2016).

Активный захват агрегатов наночастиц иллюстрируется гистологическим анализом: через 24 ч инкубации в просвете кишечника *Modiolus modiolus* в изобилии наблюдались свободно лежащие агрегаты размером до 150 мкм. Через два дня агрегаты МУНТ-2.4 в кишечнике были окружены слизью и дескваматированными фрагментами эпителия, что, по-видимому, является защитным механизмом для быстрой эвакуации агрегатов из организма.

В результате взаимодействия агрегатов МУНТ-2.4 с поверхностью кишки уже через день были отмечены эрозивные процессы в эпителии кишечника *Modiolus*, которые сопровождались набуханием соединительной ткани и тенденцией к повышенной вакуолизации клеток, что, вероятно, связано с развитием травм из-за физического и химического раздражения и механического повреждения стенки кишечника. Небольшие агрегаты, по-видимому, способны проникать в эпителиальные клетки: на второй день эксперимента в кишечные эпителиальные клетки, но мы не можем однозначно утверждать, что это действительно наночастицы.

После 24 ч инкубации в просветах канальцев пищеварительной железы наблюдались небольшие (до 50 мкм) агрегаты МУНТ, а в гистологическом строении пищеварительного эпителия отмечались патологические изменения, сходные с поражениями, наблюдаемыми в эпителии кишечника. Показано, что только самые маленькие агрегаты действительно проникают в канальцы пищеварительной железы (Koehler et al., 2008). Известно, что наночастицы, контактирующие с пищеварительными клетками, провоцируют перекисное окисление липидов (Gagnè et al., 2008)

Захват агрегатов наночастиц, сопровождаемый окислительным стрессом, описан некоторыми исследователями также и для эпителиальных клеток жабр (Gagnè et al., 2008). Наше исследование демонстрирует наличие гистопатологических изменений в жабрах мидий, подвергающихся воздействию ОУНТ. Кроме того, в эпителии жабр наблюдались явления, морфологически связанные с апоптозом.

Следует отметить, что действие наночастиц в двустворчатых моллюсках *Elliptio complanata* проявлялось также в повреждении молекул ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы (Gagnè et al., 2008). Таким образом, наличие генотоксического эффекта подразумевает стимуляцию апоптоза как механизма, который защищает ткань от неблагоприятного воздействия наночастиц. Что касается реакции гемолимфы животных, подвергнутых экспериментальному воздействию МУНТ-2.4, мы не наблюдали каких-либо изменений в общей морфологической

структуре этой ткани. Как известно, гемоциты двустворчатых моллюсков представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, включающую две основные формы клеток: агранулоциты (гиалиноциты) и гранулоциты (Anisimova, et al., 2013); у некоторых видов выделяют клетки с промежуточными морфологическими характеристиками (Anisimova, 2012). Для моллюсков *Modiolus modiolus* (= *M. kurilensis*) с помощью проточной цитометрии в гемолимфе довольно четко дифференцируются три «субпопуляции» гемоцитов – гиалиноциты (агранулоциты), полугранулоциты и гранулоциты (Anisimova, 2012), что позволяет нам рассматривать все три морфотипа как последовательные стадии созревания в одной и той же клеточной линии, где гранулоциты представляют собой стадию терминальной дифференцировки. В отличие от агранулоцитов, гранулярные гемоциты двустворчатых моллюсков характеризуются низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, содержат большое количество лизосом и секреторные гранулы и обладают высоким уровнем фагоцитарной активности и продукции свободных радикалов. При оценке воздействия стресса, в том числе токсикологического характера, как правило, наблюдается изменение доли клеток разных морфотипов. В частности, двустворчатые моллюски содержались в присутствии токсических микроводорослей, что сопровождалось появлением в гемолимфе большого количества молодых клеток и, как следствие, уменьшением доли высокодифференцированных крупных гранулоцитов (Galimany et al., 2008). Исследователи связывают эти эффекты либо с активацией пролиферативных процессов в ответ на токсический эффект (Silva et al., 2008), либо с миграцией гранулоцитов из кровообращения во внутренние органы, которые будут вовлечены в процессе фагоцитоза поврежденных клеток (Galimany et al., 2008).

Мы ожидали, что влияние наночастиц на гемолимфу *Modiolus modiolus* будет проявляться схожими эффектами, поскольку, как и в случае токсинов микроводорослей, жабры и пищеварительный тракт являются непосредственными мишенями токсического действия наночастиц. Однако ни доля клеток разных морфологических типов, ни размеры и степень сложности гранулоцитов у контрольных и под-

опытных животных не различались, несмотря на очевидные повреждения в структуре внутренних органов. Таким образом, отсутствие эффекта в этом случае может быть связано с недостаточным временем воздействия (менее 3 дней) или с высокой индивидуальной изменчивостью исследуемых параметров в популяции *Modiolus*.

В настоящем исследовании в течение 7 дней мы рассмотрели возможное влияние УНВ-1.2 на состояние пищеварительной системы трех видов беспозвоночных. Пищеварительная система была предпочтительным выбором, потому что она была более восприимчивой к чужеродным частицам. Наночастицы при попадании в толщу воды образуют относительно большие агрегаты, которые легче усваиваются по сравнению со свободно взвешенными частицами. Активное поглощение этих агрегатов наночастиц было доказано с помощью гистологического анализа и конгломератов УНВ, обнаруженных в кишечнике, покрытых слизью и подтвержденных рамановской спектроскопией.

Гистологическое исследование кишечника у всех видов беспозвоночных показало большое количество включений в апикальной части эпителиальных клеток, которые предположительно поглощаются УНВ. Также одиночные клетки, нагруженные темными включениями, были обнаружены в стенках кишечника экспериментальной группы. Мы предположили, что это клетки серии макрофагов локальной иммунной системы с поглощенными нановолокнами.

При изучении конгломератов наночастиц с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния в пищеварительной системе двух видов насекомых *Diamesa* sp. (семейство *Chironomidae*) и *Drunella cryptomeria* (семейство *Ephemerellidae*) наблюдается небольшое уменьшение количества аморфного углерода и увеличение интенсивности сигнала G-связи по отношению к D-связям. Таким образом, аморфный углерод частично биodeградирует. Остальные частицы соответствовали высокоструктурированному УНВ. Вполне вероятно, что ферменты, вырабатываемые в желудочно-кишечном тракте этих насекомых, способны окислять аморфный углерод.

В случае *Gammarus suifunensis*, напротив, наблюдалось увеличение интенсивности сигнала D-связей по отношению к G-связям. Это указывает на то, что

нановолокна подвергались процессу биodeградации в пищеварительном тракте и количество их дефектов значительно увеличивалось. Возможность биodeградации в живых организмах ранее была показана для одностенных углеродных нанотрубок (Andón et al., 2013). Связано ли это с биodeградацией УНВ в пищеварительном тракте *Gammarus suiifunensis* с их собственными ферментными системами или микроорганизмами, до сих пор неясно. Исследования влияния углеродных наноматериалов УНМ, проведенные на *Daphnia magna*, показали высокую скорость поглощения (несколько часов), но более медленные темпы ликвидации УНМ. Хотя эффекты УНМ не приводили к острой токсичности для популяции *D. magna*, скорость медленной деградации может представлять риск для более высоких уровней пищевой цепи (Freixa et al., 2018).

Мы связываем отсутствие выраженного токсического эффекта от УНВ с тем фактом, что эти членистоногие питаются донными отложениями в естественной среде, которая включает как органические компоненты, так и минеральные микрочастицы. Это может быть противодействующим механизмом, который защищает эпителий кишечника от негативного воздействия УНВ.

Наличие включений в клетках слизистой оболочки кишечника и иммунной системы свидетельствует о том, что углеродные наночастицы попадают в организм и могут оказывать на него негативное влияние. В исследовании влияния других наночастиц на два вида чешуекрылых *Spodoptera litura* и *Achaea janatal* накопление наночастиц в клеточных органеллах наблюдалось в клетках кишечника насекомых (Yasur, Pathipati, 2015).

Рассмотрим результаты другого эксперимента по оценке влияния в течение 7 дней на состояние пищеварительной системы личинок веснянки *Alloperla deminuta* (лат. *Plecoptera*) углеродных НМ МУНТ-2.2, МУНТ-2.3 и УНВ-1.1. НЧ при попадании в толщу воды образовывали большие агрегаты, которые легче усваиваются по сравнению со свободно взвешенными частицами. Активное поглощение этих агрегатов наночастиц было доказано с помощью гистологического анализа. Выраженного токсического эффекта от МУНТ-2.2, МУНТ-2.3; УНВ-1.1 мы не наблюда-

дали. Мы связываем это с тем, что эти членистоногие питаются донными отложениями в естественной среде, которая включает как органические компоненты, так и минеральные микрочастицы. Это может быть противодействующим механизмом, который защищает эпителий кишечника от негативного воздействия углеродных наноматериалов.

Реакция эпителия кишечника *Alloperla deminuta* (лат. *Plecoptera*) на НЧ TiO₂; Au; CdS; ZnS более выраженная. Хотя морфометрические показатели достоверно не отличались от показателей группы Контроль, но наблюдалась тенденция к увеличению размеров клеток эпителия. Ранее сообщалось, что эти наночастицы могут наносить ущерб репродуктивной функции и развитию как беспозвоночных, так и позвоночных (Philbrook et al., 2011). Выявленного токсического эффекта от TiO₂, Au, CdS и ZnS мы также не наблюдали. Мы связываем это с тем, что эти членистоногие питаются донными отложениями в естественной среде, которая включает как органические компоненты, так и минеральные микрочастицы.

Морфометрические показатели реакции эпителия кишечника *Alloperla deminuta* (лат. *Plecoptera*) на кремниевые наночастицы КНТ-1 и КНТ-2 в течение 7 дней достоверно не отличались от показателей контрольной группы. Выявленного токсического эффекта от КНТ-1 и КНТ-2 мы также не наблюдали. Мы связываем это с тем, что эти насекомые питаются донными отложениями в естественной среде, которая включает как органические компоненты, так и минеральные микрочастицы.

Насколько известно, существует очень мало исследований нейротоксичности *in vivo* как для одностенных углеродных нанотрубок, так и для МУНТ. В настоящем исследовании были изучены поведенческие и когнитивные эффекты на крыс МУНТ с различными диаметрами. Результаты выявили заметную склонность крыс, подвергшихся воздействию МУНТ, к депрессивному поведению, параллельное снижение когнитивных способностей и повышение уровня стресса.

В предыдущем исследовании при введении МУНТ-1.1, были затронуты память и способность к обучению крыс, обработанных МУНТ, согласно результатам теста Морриса в водном лабиринте. В настоящем исследовании была использована

серия различных тестов для исследования когнитивных способностей у крыс, в то время как у животных регистрировался стресс. Крысы, обработанные МУНТ, продемонстрировали пониженную когнитивную способность. Способ перорального введения был выбран в настоящем исследовании в отличие от предыдущих исследований. В случае перорального введения биоабсорбция зависит от характеристик вещества, физиологической среды желудочно-кишечного тракта и приема пищи. Это обычно приводит к более низкой биоабсорбции, чем при обычном внутрибрюшинном или внутривенном введении.

Несмотря на предыдущие результаты, показывающие, что МУНТ-1.1 с меньшим диаметром обладают большей токсичностью, животные, получавшие в настоящем исследовании МУНТ-2.1 с более высоким диаметром, показали одинаково значимое снижение когнитивной способности во всех тестах, причем абсолютные значения были довольно хуже, чем у животных, которые получали МУНТ, имеющий меньший диаметр.

Испытание в открытом поле и испытание UPSB показали увеличение уровней стресса у крыс, в то время как в тесте с приподнятым крестообразным лабиринтом не было зарегистрировано изменений уровней стресса у крыс. Это наблюдение можно отнести к различным экспериментальным условиям испытаний. Можно предположить, что закрытые рукава в тесте с приподнятым крестообразным лабиринтом позволяют крысе прятаться, и это является причиной наблюдаемых устойчивых уровней напряжения.

Повышенный стресс негативно влияет на исследовательскую деятельность; однако развитие локального воспаления головного мозга из-за воздействия МУНТ также может быть причиной развития когнитивных нарушений. Механистически, воспаление изменяет уровень моноаминов, приводя к когнитивной и аффективной дисфункции. Однако исследовательская деятельность отличается во время тестирования из-за высокой чувствительности к внешним факторам.

Кроме того, исследовательская деятельность в нейрофизиологии связана с активностью адрено-позитивных веществ, поскольку гиппокампальные структуры

мозга очень чувствительны к таким веществам, что приводит к нейрофизиологическому повреждению катехоламинергических систем. Можно предположить, что окислительное повреждение в гиппокампе крыс, может быть, одной из причин наблюдаемого снижения исследовательской активности и когнитивных нарушений у крыс, подвергшихся воздействию нанотрубок. Это явление может быть связано с механизмами нарушения памяти, которые являются наиболее важными компонентами когнитивного поведения. Однако, когда крыса не пытается найти какой-либо выход из стрессовых условий, наблюдается отказное поведение, которое может быть причиной, объясняющей подавление исследовательской активности в тесте открытого поля и в тесте приподнятый крестообразный лабиринт.

В заключение следует отметить, что когнитивные нарушения, вызванные воздействием МУНТ на крыс линии Вистар, вызывают озабоченность по поводу использования углеродных нанотрубок, особенно МУНТ, когда рассматривается их возрастающее применение в науке и медицине. Определение механизма токсичности, конкретных уровней токсичности посредством детальной оценки риска и разработка потенциальных защитных мер в ходе будущих исследований могут помочь обеспечить безопасное и беспрепятственное использование всех классов углеродных нанотрубок. Как можно видеть, разные виды УНВ оказывают выраженное влияние на гистологическое строение органов пищеварения при пероральном введении.

Так, подслизистая и серозная оболочка желудка, гладкая мускулатура во всех группах без патологических изменений. Но в слизистой оболочке всех экспериментальных групп (УНВ-2.2, УНВ-1.3 и УНВ-2.1) наблюдается утолщение по отношению к группе «Контроль». В кишечнике крыс всех экспериментальных групп наблюдается множество бокаловидных клеток с вакуолями, заполненными слизью и, как следствие, выраженное слизееобразование, сосуды полнокровны, что является следствием механического раздражения нановолокнами.

Ткань печени отреагировала менее выражено: можно лишь отметить, что при введении УНВ наблюдается более выраженное полнокровие сосудов и инфильтрация эритроцитами. Есть также реакция иммунной системы: при введении УНВ-1.3 и УНВ-2.1 в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликул.

Выраженное токсическое свойство, связанное, по-видимому, как и другие обнаруженные эффекты, с механическим повреждением ткани, заключается в дистрофических изменениях и некрозах слизистой в группе УНВ-2.2. Возможно, это связано с меньшим размером УНВ, возникающим при размоле, и большой площадью поверхности агрегатов (до $8983,11 \text{ см}^2/\text{см}^3$).

В целом наши результаты созвучны с данными других исследователей. В работе (Magrez et. al 2006) изучали зависимость токсичности нанотрубок и нановолокон от соотношения длина/диаметр и наличия различных функциональных групп на их поверхности. Токсичность многослойных нанотрубок оказалась ниже токсичности нановолокон, причем токсичность нанотрубок возрастала с увеличением отношения длина/диаметр.

Были определены возможные нейроповеденческие нарушения, вызванные пероральным приемом УНВ, и связанные с этим изменения концентраций модулятора воспаления в крови. Оценка безопасности углеродных наночастиц является неотъемлемой частью гигиены труда и окружающей среды в результате использования и утилизации НМ. Однако современные знания о биологических последствиях, связанных с различными путями их воздействия, остаются неясными (Guseva Canu et al., 2016). Различные пути введения углеродных нанотрубок (УНТ) в организм приводят к уникальным особенностям биораспределения. Инъецированные внутривенно УНТ или УНВ накапливаются в легких и в меньшей степени в селезенке и печени в течение 24 ч, и они в основном выводятся через почки. С другой стороны, орально вводимые УНТ или УНВ в основном выводятся через кишечник, тогда как их очень мало распределяется по периферическим органам. Кроме того, внутрибрюшинная инъекция приводит к накоплению наночастиц в селезенке, и быстрое удаление из других органов происходит в течение 2 ч (Liang, Lehmann, 2010). УНВ не проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и

требуют введения *in situ*. Таким образом, УНВ могут проявлять свои системные эффекты посредством распределения в восприимчивых органах после абсорбции или путем производства медиаторов воспаления (Aschberger, Johnston, 2010). Блуждающий нерв, иммунная система и нейроэндокринные пути составляют ось кишечника и мозга, которая может быть связана с психоневрологическими расстройствами через ее пагубную роль в нейротрансмиссии, а также в поведении (Sandhu., 2016). Утечка содержимого просвета кишечника в слизистую оболочку кишечника может стимулировать нарушения, связанные с иммунной активацией, и последующее повреждение тканей. Таким образом, нарушение кишечного барьера может привести к локальному и системному воспалению, вызывая впоследствии повреждение в нескольких органах, включая легкие и мозг, и может вызывать синдром системного ответа (César Machado, da Silva, 2016). Кишечное нейрональное фенотипическое разнообразие очень широкое и интересное, кишечная нервная система и центральная нервная система имеют одинаковый набор нейротрансмиттеров.

Цитокины, воздействуя на нейроциркуляцию и нейротрансмиттеры, играют ключевую роль в поддержании нормальных функций мозга и поведенческих изменений. Острое воспаление и высвобождение цитокинов или активация врожденного иммунного ответа способствуют адаптивным поведенческим изменениям, которые направляют энергию организма на борьбу с инфекцией или восстановление после полученного повреждения. Однако хроническое состояние с постоянно увеличивающимися провоспалительными цитокинами и постоянными изменениями в нейротрансмиттерных системах может спровоцировать психоневрологические расстройства и поведенческие изменения (Felger, Lotrich, 2013). Даже незначительные модификации гомеостаза центральной нервной системы (ЦНС) могут ощущаться микроглией, которая является одним из ключевых регуляторов воспаления ЦНС. Провоспалительные медиаторы, высвобождаемые этими клетками, вызывают различные нейроиммунологические нарушения в результате патофизиологических изменений. Медиаторы, полученные из микроглии, такие как хемокины, вызывают рекрутирование воспалительных клеток в область поражения после серьезных проблем, таких как травма головы, ишемия или нейродегенерация, а также в случаях

длительного воздействия легких нарушений. Критическая роль дисрегуляции между про- и противовоспалительными цитокинами в хроническом легком стресс-индуцированном поведении возможна из-за дисбаланса цитокинов, который влияет на нейронные цепи.

В общем, реакции иммунной системы на вызовы — это всегда организованный ответ многих факторов. Поэтому мы исследовали роль нескольких цитокинов/хемокинов в текущем исследовании. Ранее было показано, что острое воздействие загрязнения воздуха увеличивало провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-6 в кровообращении. Кроме того, хемоаттрактант IL-8 увеличивается в местах локального воздействия после ингаляции (Kim et al., 2016). С другой стороны, противовоспалительные цитокины, IL-4 и IL-10, также увеличиваются в условиях стресса, что указывает на то, что нейроповеденческие изменения могут быть связаны с изменением регуляции и контррегуляции воспаления (Himmerich, Bartsch, 2013). Мозг, а также иммунная система являются основными органами, которые легко приспосабливаются к воздействиям окружающей среды. Гормоны, которые секретируются и доступны на периферических участках или локальных эффекторных нейромедиаторах, и нейропептиды являются ключевыми регуляторами функций иммунной системы. Провоспалительные цитокины IL-1, IL-6 и фактор некроза опухолей (TNF) синтезируются в ответ на активацию системы стресса, тем самым изменяя взаимодействие нейротрансмиттеров и приводя к таким симптомам, как сонливость, усталость, потеря аппетита. Цитокины, IL-4, IL-10 и IL-13 по-разному зависят от нейротрансмиттеров и нейропептидов. Вещество P и родственная пептиду ген кальцитонина широко присутствуют в ЦНС и желудочно-кишечном тракте. При хронической иммунной активации симпатическая нервная система (СНС) и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГН) выделяют огромное количество IL-1, IL-6 и TNF- α . Таким образом, избыточное высвобождение цитокинов, стимуляция афферентного блуждающего нерва запускают ось НРА и симпатическую нервную систему (Elenkov et al., 2000).

Наши результаты показали, что в группах, получавших УНВ в течение 14 дней, был обнаружен один аспект болезни – снижение двигательной активности.

Кроме того, были обнаружены значительно повышенные уровни IL-6 и IL-10 в плазме, но не IL-1 β , IL-8, IL-18. Как описано, без специальной функционализации УНВ не будут преодолевать гематоэнцефалический барьер и не будут оказывать прямого токсического воздействия на ЦНС. Тем не менее, как отмечается во многих публикациях, УНВ активируют окислительный стресс и воспалительные механизмы (Liu et al., 2014).

В литературе достаточно данных, демонстрирующих поведенческие аспекты в нейроиммунологии. Как главные игроки и посредники передачи сигналов между ЦНС и периферией, неоднократно описывались IL-1 β и IL-6. Автор продемонстрировал различные аспекты болезненного поведения после иммунной активации, которые включают двигательную гипоактивность, ангедонию, анорексию, депрессию, нарушение когнитивных функций и повышенную тревожность. Кроме того, повышенные мозговые уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α ответственны за участие медиаторов воспаления ЦНС в симптомах тревоги (de Miranda et al., 2011). Из них Т-клетки и макрофаги высвобождают IL-6, который легко проникает через гематоэнцефалический барьер и стимулирует иммунный ответ и инициирует синтез простагландина E2 в гипоталамусе. В текущем исследовании IL-1 β увеличился, но не достиг значительного уровня в обеих группах. Действительно, IL-1 β является конечным медиатором воспалительного ответа и участвует в различных клеточных функциях, таких как пролиферация, дифференцировка и апоптоз. Индукция циклооксигеназы-2 (COX2) IL-1 β в ЦНС способствует воспалительным изменениям (Samad, Moore, 2001). Напротив, IL-10 подавляет экспрессию цитокинов Th1, основного комплекса гистосовместимости, антигены класса II и костимулирующие молекулы на антигенпрезентирующих клетках, макрофагах. В нашем исследовании концентрации IL-6 в группах, получавших УНВ-2.1 и УНВ-2.2, были в 2,4 и 3,4 раза выше, чем в контрольной группе. Концентрации IL-10 в плазме также были значительно выше в обеих обработанных группах по сравнению с контрольной группой. Таким образом, избыточность разнообразия цитокинов положительно связана с выраженностью симптомов депрессии и тревоги (Vogelzangs et al., 2016).

Тем не менее в прошлом были спорные дискуссии относительно интерпретации единичных поведенческих тестов, которые использовались в этом контексте, потому что могут быть неверные интерпретации, особенно в отношении когнитивной функции, основанные на вероятности игнорирования смешанных параметров: например, влияние локомотора гипоактивности по показателю считывания в когнитивных тестах, таких как водный лабиринт Морриса (Cunninghama, Sanderson, 2012). Поэтому в настоящем исследовании мы использовали набор различных систем поведенческих тестов (открытое поле, приподнятый лабиринт и универсальный бокс для решения проблем (UPSB)), чтобы охватить и дифференцировать различные аспекты двигательного, эмоционального и когнитивного поведения.

Наши результаты показали, что хроническое потребление УНВ с пищей в течение 14 дней вызывало значительное снижение двигательной активности, но не оказывало существенного влияния на эмоции, мотивацию и познание. Этот вывод можно сделать из того факта, что двигательная активность была значительно снижена в открытом поле и в приподнятом лабиринте для группы, получавшей как УНВ-2.1, так и УНВ-2.2. Группа УНВ-2.2, казалось, была немного более затронута, поскольку также было значительно уменьшено изгибное движение. В отличие от этого, никаких серьезных различий в тесте UPSB обнаружено не было. Это указывает на то, что в целом крысы не страдают от когнитивных нарушений, потому что для выполнения этой задачи требуются способности к пространственной ориентации, обучению и памяти. Кроме того, мы заключаем, что обработанные крысы не страдают ангедонией, поскольку наши результаты показывают, что они были так же мотивированы, как и контрольная группа, для поиска пищи в тесте UPSB.

Что касается параметров, представляющих исследовательское поведение или тревогу, обработанные группы не отличались от контрольной группы. Таким образом, время в открытом/закрытом рукаве в приподнятом крестообразном лабиринте, в тесте «открытое поле» не было значительно изменено. Тем не менее животные, которые получали УНВ-2.1, но не крысы с УНВ-2.2, показали значительно увеличенное замерзание в условиях открытого поля и общее сниженное исследователь-

ское поведение в приподнятом лабиринте. Значительно более низкие значения отношения концентраций IL-10/IL-6 в крови в группе УНВ-2.1 показали, что у этих животных преобладает провоспалительный ответ. В группе УНВ-2.2 высокое соотношение IL-10/IL-6 соответствовало обнаруживаемой гипо-локомоции, но не было никаких изменений в параметрах других поведенческих категорий, включая отсутствие повышенной реакции замораживания.

Таким образом, наши результаты показали, что мягкий поведенческий эффект, вызванный пероральным приемом УНВ, можно охарактеризовать как сохраненное эмоциональное состояние, нормальные когнитивные способности и только избирательно сниженную двигательную активность.

Тем не менее наше исследование имеет некоторые ограничения. У этих животных выборочно выбранные тест-системы могли вызывать только слабый/умеренный стресс, такой как стресс, вызванный новой средой и ростом, но не вызывать отрицательных раздражителей. В этом отношении стресс можно рассматривать как важный параметр, который влияет на поведенческий статус животных (Henrich-Noack, 2014). Следовательно, при применении авersive стимулов нейрорповеденческие эффекты иммуномодуляции УНВ могут отличаться от текущих результатов.

Кроме того, было продемонстрировано, что ограничение калорийности снижает концентрацию IL-6 и улучшает поведение при заболевании после воспалительного стимула. Следовательно, ограниченный доступ к пище может также способствовать в значительной степени сохраненным эмоциональным и когнитивным способностям у крыс, получавших УНВ.

Наше исследование свидетельствует об отсутствии патологических морфологических изменений в строении желудка вследствие введения частиц куликовского цеолита. Макрочастицы цеолитов Куликовского месторождения размером 10–50 мкм не вызывают выраженных деструктивных морфологических проявлений, вызывая лишь инфильтрацию и воспаление и в единичных случаях некрозы.

В качестве практических рекомендаций стоит отметить, что при дроблении цеолитовых туфов и других минералов для использования в ветеринарной практике

необходимо контролировать режим и условия дробления и проводить гранулометрический контроль фракций.

Разные виды УНВ оказывают влияние на гистологическое строение почек и селезенки при пероральном введении в исследованной дозировке 500 мг/кг в течение 14 дней. Мы отмечаем лишь незначительные патологические изменения, такие, как локальные некрозы, стаз сосудов и инфильтрацию в почках, уменьшение лимфоидных фолликулов, полнокровие и стаз в селезенке.

В первый день эксперимента нанотрубки были идентифицированы на уровне барьера слизистой оболочки стенки пищевода в области сердца, дна и антрального отдела желудка. На 2 и 3-й дни наночастицы проникали через слизистую оболочку и эпителиальные барьеры в двенадцатиперстную кишку и стенки тонкой и толстой кишки. Стадия 2 прохождения нанотрубок через эпителиальный барьер представляла собой эпителиальную цитоплазму. Сначала нанотрубки занимали пограничную зону в эпителиальной апикальной части, а затем достигли базальной мембраны, где образовали линию, параллельную базальной мембране.

Скорость миграции нанотрубок, вводимых перорально через эпителий слизистой оболочки кишечника, была выше, чем через эпителиоциты слизистой оболочки желудка. В условиях кратковременного эксперимента не наблюдалось распознавание рецепторов, было обнаружено только загрязнение наночастицами в эпителиоцитах. Это было параллельно секреторная гиперактивность железистого эпителия, защитная реакция слизистой оболочки.

Идентификация тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки тонкого кишечника может быть результатом реакции на оральные нанотрубки. Гистофизиология тучных клеток предполагает, что они были вовлечены в привлечение макрофагов (посредством продуцирования соответствующих цитокинов) и индуцированных (посредством секретирования локальных регуляторов гомеостаза) изменений проницаемости просвета микроциркуляторного русла для элиминации наночастиц через систему портальных вен в печень для детоксикации.

Генерализованная реакция иммунной системы на пероральное введение нанотрубок осуществлялась за счет гипертрофии лимфоидных структур в собственной пластинке слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, гипертрофии фолликулов в почечной капсуле и паренхиме и гипертрофии мальпигова тела в белой пульпе селезенки. Мы предположили, что гипертрофия лимфоидной ткани в желудочно-кишечной стенке и селезенке является результатом индукции иммунного ответа эпителиоцитами, загрязненными углеродными нанотрубками, с последующей презентацией антигена эффекторными иммунными клетками.

Динамика миграции НЧ золота после подкожного введения мышам была следующей. На 2-й день после инъекции, НЧ золота фагоцитировались в интерстициальной ткани, предположительно, двумя типами макрофагов: моноцитами и Т-клетками. Моноцитарные фагоциты доставляли НЧ в кровеносные сосуды и высвобождали их в кровь в результате гибели клеток и разрыва мембран; Т-клетки доставляли НЧ в лимфоидную ткань лимфатического узла для презентации антигена и индукции бласт-трансформации эффекторных клеток трансплантационного иммунитета. На 2-й день число интернализированных НЧ в макрофагах и количество фагоцитов, мигрирующих в кровеносные сосуды, увеличивались. Эндотелий сосудов был гипертрофирован, гипертрофия развивалась не по всей поверхности внутренней сосудистой стенки, а только в зоне, прилегающей к месту инъекции НЧ; гипертрофия привела к гибели эндотелиоцитов. На 2 и 3-й дни макрофаги мигрировали в двух направлениях: к кровеносным сосудам и к Т-зависимым зонам на периферии лимфоидного фолликула для представления антигена.

На 4-й день были обнаружены макрофаги, мигрирующие в просвет сосудов, их цитоплазма была переполнена НЧ. Были выделены два механизма высвобождения НЧ в просвет сосудов: одна группа макрофагов высвобождала НЧ посредством дегрануляции, а другая – в результате смерти.

Согласно нашим результатам, через стенку сосудов мигрировали макрофаги, содержащие НЧ золота в цитоплазме, но не сами частицы. Данные о динамике миграции НЧ золота из места введения в просвет капилляра имеют большое значение

для разработки диагностических и лечебных мероприятий. Диагностические и терапевтические меры, направленные на лечение опухоли, должны быть реализованы на 2-й день после локальной подкожной инъекции НЧ золота, так как на 3-й день большая его часть фагоцитируется и мигрирует в разных направлениях от фокуса, а эффективность лечения будет низкой в более поздние периоды после инъекции.

Следовательно, наши данные подтверждают, что фагоцитарные эффектор-ные клетки, нагруженные НЧ золота, разрушают сосудистую стенку, что приводит к увеличению ее проницаемости из-за гибели эндотелия. Предположительно, механизм ингибирования продукции VEGF и отсутствие ангиогенеза в опухоли обусловлены дезактивацией VEG-продуцирующих макрофагов в результате фагоцитоза большого количества НЧ.

Биологические свойства некоторых минералов (главным образом из группы алюмосиликатов, в том числе минералы глины, цеолиты и полевые шпаты) давно известны и изучаются в рамках традиционной медицины и ветеринарии. С некоторых пор активно изучаются также и цитотоксические свойства некоторых минералов (Амосов, 1992).

Наши исследования влияния частиц минералов на эпителиоциты желудка мыши практически во всех экспериментальных группах выявили воспалительную реакцию, которая проявлялась чаще всего в инфильтрации, в некоторых случаях наблюдался некроз. Разнообразная реакция эпителия желудка (от нейтральной до воспалительной) на частицы разных фракций цеолититового туфа разных месторождений подтверждается данными морфометрии.

Мы считаем, что характер действия частиц минералов на клетки и ткани зависит от их специфических физико-химических свойств, в том числе от поверхностного заряда, который зависит от типа минерала, размера частиц и варианта их измельчения. По нашим данным поверхностный заряд частиц может меняться от -35 до -7 мВ. Поскольку заряд поверхности клетки может меняться от -90 до -70 мВ, заряд минеральных частиц может значимо влиять на биохимические мембранные процессы. Действие минералов может зависеть также от характера и

удельной поверхности нано-, микро- и мезопор на единицу площади, от концентрации кислотных центров Бренстеда и Льюиса, влияющих на сорбцию/десорбцию органических молекул и способность к катализу. Действие минерала зависит также от его типа, по сути – от строения его кристаллической решетки (при этом острые углы микрокристаллов могут напрямую повреждать клетки).

При попадании, собственно, в клетку, как и во внутренние среды (кровь, лимфу), на первое место по значимости выходят гранулометрические характеристики минеральных частиц (такие как арифметический диаметр, удлинение, форм-фактор и т.д.), которые влияют на кинетику и накопление частиц в тех или иных органах.

Из полученных нами данных следует, что нано- и микрочастицы цеолитов оказывают местное токсическое действие при их внутримышечном введении intactным животным. В течение 10 сут введения частиц цеолитов развиваются некроз мышечных волокон и воспалительный процесс. При этом частицы цеолитов захватываются макрофагами и накапливаются в их лизосомальном аппарате. Как результат деструктивных изменений, в мышечной ткани бедра происходит возрастание транспортной и детоксикационной функции регионарных паховых лимфатических узлов – расширение краевого и мозговых синусов и увеличение макрофагов. Частицы цеолитов обнаруживаются в цитоплазме эпителиоцитов проксимального отдела почки, приводят к нарушению микроциркуляции в почке и печени. Внутримышечное введение частиц цеолита обуславливает тромбоз сосудов легких, что может свидетельствовать о развитии системного воспалительного ответа.

Наночастицы на основе углерода МУНТ и УНВ в целом показали свою относительно низкую экотоксичность. Токсический эффект вызван в основном примесями. Для всех животных наиболее опасными являются металлические наночастицы. Кремниевые наночастицы тоже оказывали токсическое действие, преимущественно на водоросли.

Краткое описание биологических эффектов углеродных, кремниевых и металлических наночастиц приводится на рис. 109.

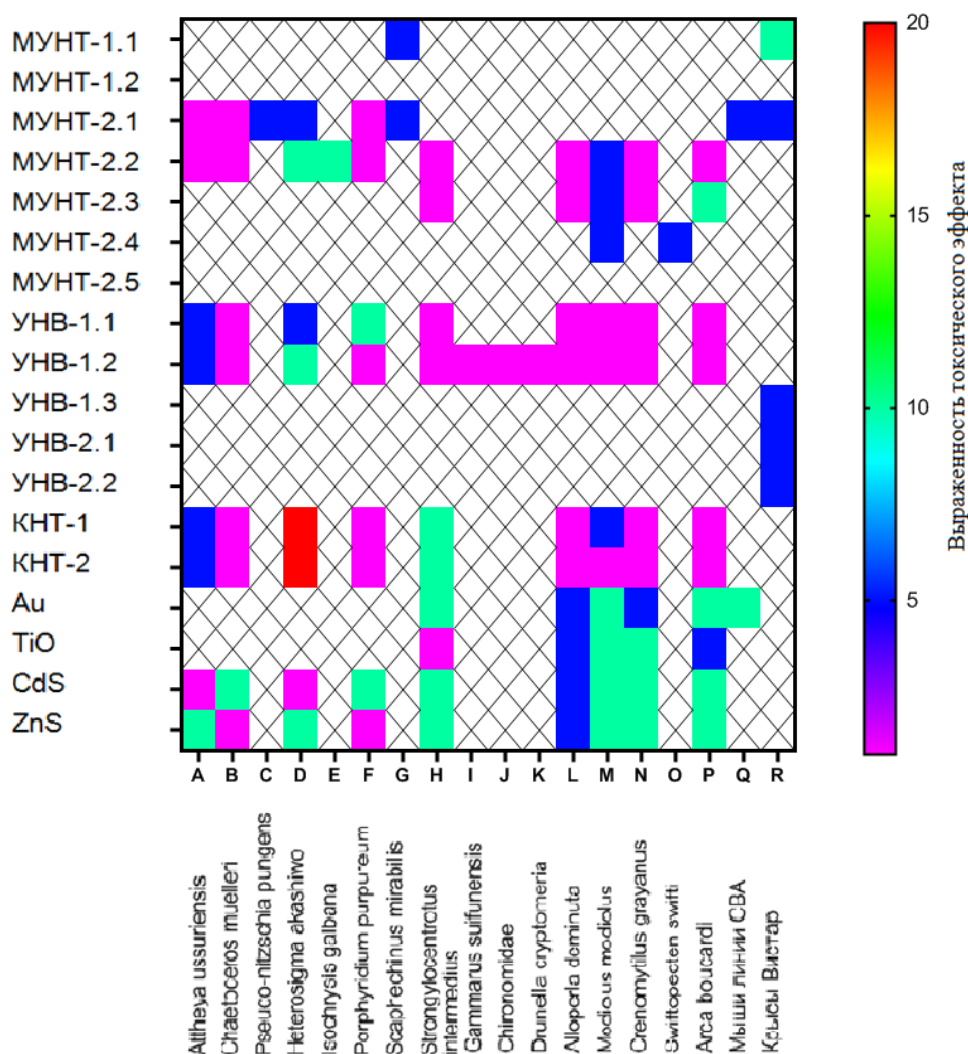


Рис. 109. Сравнение экотоксикологических эффектов углеродных, кремниевых и металлических наночастиц

Как мы можем видеть, наиболее токсичными для животных оказались кремниевые и металлические наночастицы, в отличие от углеродных, которые оказались более или менее биологически инертными.

Кроме этого, углеродные НМ, в отличие от остальных, подвергаются биотрансформации, что служит благоприятным прогностическим фактором.

7.3. Рекомендации к изменению норм и методов контроля, состояния среды и ее охране от новой экологической угрозы

Возрастающие с каждым годом объемы производства различных видов наночастиц и расширение сферы их применения увеличивают угрозу нанозагрязнения. Наночастицы известных веществ обладают уникальными свойствами, которые все еще необходимо изучать. Это требует разработки новых и совершенствование старых нормативных документов и методов контроля загрязнения окружающей среды. Необходимо также разработать методы защиты от нового типа загрязняющих веществ. Организациям, занимающимся охраной труда и экологической безопасностью требуется разработать методы контроля и защиты рабочих на всех этапах использования наночастиц от производства до утилизации. Переработать нормативные акты по допустимому уровню загрязнения синтезированными наночастицами окружающей природной среды.

Помимо контроля и защиты от новых загрязнителей синтезированных наночастиц, также необходимо изучить степень опасности привычных загрязнителей в наноразмерном диапазоне, различные виды пылевого загрязнения на производстве и в окружающей природной среды. Для этого следует заново с использованием новейшего научного оборудования и методов оценить опасность старых загрязнителей и скорректировать существующие нормы.

Необходимо изучать и разрабатывать способы утилизации различных видов наночастиц, поскольку они довольно устойчивы в окружающей среде и долгое время могут представлять опасность для здоровья населения. Требуется разработать методы борьбы с нанозагрязнением при попадании их в окружающую среду во время аварий при производстве и транспортировке.

Так же требуется переработка образовательных программ по медицине, биологии, экологии охране труда и включение в них новейших данных об особенностях и опасности нового вида загрязнителя наноматериалов. Пока еще нет данных о крупных авариях и поступлении наночастиц в окружающую среду, но такое может случиться. Поэтому необходимо работать на опережение и быть готовыми противостоять новой опасности.

ВЫВОДЫ

1. Нами выявлены физико-химические свойства основных видов наноматериалов, определяющих их токсические свойства, что позволяет нам их ранжировать по возрастанию их опасности в следующем порядке: на основе углерода (наличие примесей металлов, форма-фактор); минералов (физическое повреждение клеток и микроорганизмов); кремния (физическое повреждение клеток и микроорганизмов); металлов и их оксидов (размер наночастиц позволяет проникать в клетку).

2. Наночастицы всех химических типов долго не осаждаются в водной среде (до 7 сут пребывают во взвешенном состоянии в модельном эксперименте). В первые часы и сутки оседают только крупные конгломераты НЧ, а представляющие наибольшую экотоксикологическую опасность мелкие наночастицы в открытых водоемах, где происходит естественное перемешивание, могут находиться во взвешенном состоянии продолжительное время.

3. Наибольшее влияние на микроводоросли, в эксперименте показали КНТ и квантовые точки, угнетая их жизнедеятельность за счет фотоактивности под видимым и ультрафиолетовым излучением и возможного выделения ионов токсичных металлов. Влияние на продуцентов МУНТ и УНВ менее выраженное и может быть объяснено не только наличием металлических примесей, но и тем, что НЧ, находящиеся во взвешенном состоянии, препятствуют прохождению солнечного света.

4. Наибольшее влияние на физиологию беспозвоночных, в эксперименте показали КНЧ и НЧ металлов и оксидов металлов. УНЧ показали себя как менее опасный экотоксикологический фактор. Микро- и наночастицы минералов за счет своей формы, приводящей к повреждению клеток эпителия кишечника, также являются экотоксичными при поступлении с пищей.

5. Максимальный токсикологический эффект НЧ проявляется на клеточном уровне, вызывая повреждение и гибель клеток (гемоциты, половые клетки и микроводоросли). Влияние на тканевом уровне менее выражено и проявляется воспалением, отеком, очагами некроза (вплоть до некроза кишечника при влиянии

природных НЧ). Токсическое влияние НМ на организменном уровне у живых существ проявляется снижением двигательной активности, увеличением уровня стресса и понижением когнитивных способностей. Следовательно, любые синтетические и природные наночастицы оказывают негативное влияние на всех уровнях и у всех животных.

6. Изучение биотрансформации наночастиц в организме изученных видов показало, что барьерные механизмы, препятствующие их поступлению в клетки практически отсутствуют, как и надежные механизмы инкорпорации. Мы обнаружили лишь у двух видов насекомых – *Diamesa* sp. (семейство Chironomidae) и *Drunella cryptomeria* (семейство Ephemerellidae) – способность к частичному био-разложению аморфного углерода УНВ, что доказывается появлением в течение 7 дней большого количества дефектов, небольшим уменьшением количества аморфного углерода и увеличением интенсивности сигнала связи G по отношению к связям D. Это свидетельствует о высоком уровне опасности нанотоксикантов.

7. Крысы линии Вистар, перорально получавшие МУНТ и УНВ продемонстрировали увеличение уровней стресса и пониженную когнитивную способность, причем абсолютные значения были худшими у животных, которые получали МУНТ и УНВ меньшего диаметра.

8. Изучение ответных реакций изученных видов однозначно свидетельствует, что поступление в окружающую среду и накопление в ней нанотоксикантов следует рассматривать как новую до конца не осознанную экологическую опасность. В работе обоснована необходимость более широкого ее изучения, указаны основные направления проведения санитарно-гигиенических, инженерных, экосистемных и других исследований, установлены пороговые значения безопасных концентраций нанотоксикантов (без учета их пролонгированного воздействия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаева Л.Ф., Шумский В.И., Петрицкая Е.Н. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра // Альманах клинической медицины. 2010. № 22. С. 10-16.
2. Амосов Р.А., Двуреченская С.С. Минералы-убийцы // Руды и металлы. 1992. №1. С. 152-155.
3. Арчаков А.И. Нанобиотехнологии в медицине: нанодиагностика и нанолечения // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56. № 1. С. 7-25.
4. Баталова Т.А. Психобиологические особенности при комплексной коррекции у крыс: автореф. дис. д-ра биол. наук. Дальневост. гос. аграр. ун-т. Благовещенск. 2011. 39 с.
5. Бородкин Г.И. Нанотехнологии и экологическая безопасность // Сиббезопасность Спассиб. 2011. № 1. С. 16-21.
6. Бричкин С.Б. Физико-химические свойства наночастиц и гибридных наноструктур в мицеллярных и коллоидных растворах: автореф. дис. д-ра хим. наук. Черноголовка. 2011. 47 с.
7. Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи // В кн.: Объекты биологии развития. 1975. М. Наука. С. 188-216.
8. Буслович С.Ю., Котеленец А.И., Фридлянд Р.М. Интегральный метод оценки поведения белых крыс в открытом поле // Журн. высшей нервной деят. 1989. № 1. С. 168-171.
9. Васюкова И.А., Гусев А.А., Халиуллин Т.О. Многостенные углеродные нанотрубки и их влияние на показатели мужской репродуктивной системы // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2014. Т. 6. № 1(18). С. 10-15.
10. Величковский, Б.Т. Об экспресс-методе прогнозирования возможного патологического влияния наночастиц на организм // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2009. № 4. С. 72-76.
11. Вдовина Н.В., Клинцева Е.С., Щербатюк Т.Г. Исследование особенностей поведения здоровых крыс разного возраста и крыс-опухоленосителей в «открытом поле» // Современные технологии в медицине. 2010. № 2. С. 12–16.

12. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы медицинской химии. 1989. №1. С. 127-131.
13. Галактионова Л.П., Ельчанинова С.А., Молчанов А.В., Варшавский Б.Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Клин. лаб. диаг. 1998. № 6. С. 10-14.
14. Голохваст К.С., Паничев А.М., Мишаков И.В., Ведягин А.А., Мельгунов М.С., Данилова И.Г., Козлова И.Г., Габуда С.П., Мороз Н.К., Мельгунов М.С., Кисилев Н.Н., Чайка В.В., Гульков А.Н. Экотоксикология нано- и микрочастиц минералов // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т.13. №1 (5). С. 1256-1259.
15. Голохваст К.С., Кузнецов В.Л., Кусайкин М.И. Влияние некоторых синтетических и природных наночастиц на развитие личинок морского ежа // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2013. Т. 5. №2(15). С. 36-40.
16. Голохваст К.С., Черепанова Е.М., Андрейко М.П. К вопросу о токсичности техногенных наночастиц, как возможного нового абиотического фактора среды // Вологдинские чтения. 2010. №78. С. 218-220.
17. Голубева Н.И., Полищук С.Д. Токсичность различных наноматериалов при обработке семян яровой пшеницы // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П.А. Костычева. 2012. №4(16). С. 21-24.
18. Горшенева, Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2014. Т.6. №1(18). С. 48-55.
19. Григорьев Н.Р. Метод количественной оценки поисковой активности и отказа от поиска в эксперименте у крыс // Журнал высшей нервной деятельности. 1996. Т. 46. № 2. С. 400-405.
20. Гусев А.А., Акимова О.А., Крутяков Ю.А. Влияние высокодисперсных частиц различной природы на ранние стадии онтогенеза растений рапса (*Brassica napus*) // Науковедение. 2013. №5 (18). С. 11.

21. Гусев А.А., Зайцева О.Н., Полякова И.А. Предварительные результаты комплексного биотестирования углеродного наноматериала – перспективного носителя лекарственных препаратов // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2010. Т. 15. №5. С. 1538-1540.
22. Гусев А.А., Полякова И.А., Горшенева Е.Б. Половые различия физиологического эффекта углеродного наноструктурного материала – перспективного носителя лекарственных препаратов в эксперименте на лабораторных мышах // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2010. Т. 21. №13. С. 107-112.
23. Гусев А.А., Родаев В.В., Васюкова И.А. Исследование содержания аэрозольных наночастиц в воздухе рабочей зоны нанотехнологического производства и оценка воздействия наноматериала на бактерии на примере углеродного наноматериала «ТАУНИТ» // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18. №1. С. 299-303.
24. Диесперова Н.А., Заволокина Л.И. Институциональные условия развития нанопромышленности: опыт РФ и США // Вестник Челябинского государственного университета. 2018. № 8 (418). Экономические науки. Вып. 62. С. 16-33.
25. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы // Казанский медицинский журнал. 2008. Т. 89. № 1. С. 1-7.
26. Злобина О.В., Бугаева И.О., Маслякова Г.Н., Фирсов С. С., Бучарская А. Б., Хлебцов Н. Г., Хлебцов Б. Н., Дыкман Л.А. Морфокинетика клеточных популяций мезентериальных лимфатических узлов под влиянием золотых наночастиц в эксперименте // Саратовский научно-медицинский журнал. 2011. Т. 7. № 2. С. 354-357.
27. Ибраев С.А., Отаров Е.Ж., Жарылкасын Ж.Ж., Калишев М.Г., Жакетаева Н.Т. Влияние наночастиц на организм в производстве хризотила / сб. тр. «Онкология. – XXI век»: материалы XIX Междунар. науч. конф. «Онкология – XXI век», V Ит.-рос. науч. конф. по онкологии и эндокринной хирургии, XIX Междунар. науч. конф. «Здоровье нации – XXI век», Светлогорск, 28 апр. 03 мая 2015 г.:

- Светлогорск. 2015. С. 155–159.
28. Иванов Д.Г., Подковкин В.Г. Взаимосвязь уровня метаболизма коллагена и поведения крыс в тесте «открытое поле» // Успехи современного естествознания. 2010. № 5. С. 16–20.
29. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы // Известия Коми научного центра УРО РАН. 2012. №9. С. 46-55.
30. Иншаков О.В., Иншакова Е.И. Технологические платформы в российской нанопромышленности: проблемы и перспективы развития // Вестник ВолГУ. Серия 3, Экономика. Экология. 2017. Т. 19. № 3. С. 7-20.
31. Каркищенко, Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // Биомедицина. 2009. Т.1. № 1. С. 5-27.
32. Кит О.И., Златник Е.Ю., Передреева Л.В., Червонобродов С.П. Торможение роста перевариваемой опухоли с помощью функционализированных коротких одностенных углеродных нанотрубок // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156. №9. С. 348-351.
33. Латышевская Н.И., Стрекалова А.С. Экологические проблемы развития нанотехнологий // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 3: экономика, экология. 2011. Т.3. №1. С. 224-230.
34. Латышев Я.В., Павлова В.И., Мамылина Н.В., Камскова Ю.Г. Влияние эмоционально-болевого стресса на поведенческую активность крыс в тесте «открытое поле» // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: «Образование, здравоохранение, физическая культура». 2006. Вып. 7. Т. 1. № 3 (58). С.178–179.
35. Маторин Д.Н., Каратеева А.В., Осипов В.А., Лукашев Е.П., Сейфуллина Н.Х., Рубин А.Б. Влияние углеродных нанотрубок на параметры флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Российские нанотехнологии, 2010. №5-6. С. 71-76.
36. Митрофанова И.В., Мильто И.В., Суходоло И.В., Васюков Г.Ю. Возможности биомедицинского применения углеродных нанотрубок // Бюллетень Сибирской

- медицины. 2014. Т.13. №1. С. 135-144.
37. Муртазина Э.М., Лефтерова О.И. Основные вехи в развитии нанотехнологии (обзор зарубежных публикаций) // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. №10. С. 45-49.
38. Орлова Т. Ю., Айздайчер Н. А., Стоник И. В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фикотоксинов: научно-методическое пособие. – Владивосток: Дальнаука. 2010. С 75– 80.
39. Остроумов С.А., Колесов Г.М., Поклонов В.А., Котелевцев С.В. Водный макрофит как фактор потенциального концентрирования: взаимодействие с наночастицами металла // Экологическая химия. 2009. Т. 18(4). С. 222-228.
40. Остроумов С.А., Колесов Г.М. Водный макрофит *Ceratophyllum demersum* иммобилизует Au после добавления в воду наночастиц // Доклады академии наук, 2010. Т. 431. № 4. С. 566–569.
41. Поляков В.В., Старченко И.Б., Джуплина Г.Ю. Перспективы применения нанотехнологий в биомедицинской инженерии // Известия Южного федерального университета. Технические науки. 2008. Т. 82. №5. С. 216-220.
42. Попов Е.М. Эколого-экономическое обоснование перспективности развития технологий, основанных на применении самых распространенных наночастиц // Научный вестник Московского государственного горного университета. 2013. № 11. С. 194–198.
43. Постнов В.Н., Наумышева Е.Б., Королев Д.В., Галагудза М.М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов // Биотехносфера. 2013. №6(30). С. 16-27.
44. Рыбалкин С.П., Михина Л.В., Онацкий Н.М. Изучение токсичности наноструктурированного углерода в форме одностенных углеродных нанотрубок и укороченных одностенных углеродных нанотрубок при ингаляционном пути поступления крысам // Прикладная токсикология. 2013. Т.4. №1(9). С. 32-39.
45. Саркисян М.А., Воропаев С.А., Аронин А.С. Проблемы применения углеродных наноструктур в имплантологии // Dental Forum. 2014. №3. С. 17-20.

46. Саяпина Н.В., Баталова Т.А., Чайка В.В., Кузнецов В.Л., Сергиевич А.А., Колосов В.П., Перельман Ю.М., Голохваст К.С. Многослойные углеродные нанотрубки увеличивают тревожность крыс и снижают исследовательскую активность в тесте "открытое поле" // Доклады академии наук. 2015. Т. 464. №1. С.115-118.
47. Сейфулла Р.Д., Суслина З.А., Куликова Е.В. Перспективы применения нанотехнологий в клинической неврологии // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2008. Т. 2. №2. С. 35-44.
48. Середенин С.Б., Дурнев А.Д. Мутагены (Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М.: Медицина. 1998. С. 328.
49. Тимофеева, А.В., Ильина М.В., Терехова Л.П. Получение наноконплексов типа «Таунит»-антибиотик и исследование их антифунгальной активности в отношении *Aspergillus niger* и *candida albicans* // Биотехнология. 2014. №3. С.18-23.
50. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казанский медицинский журнал. 2009. Т. 90. № 4. С. 578-584.
51. Хабашеску В.Н. Ковалентная функционализация углеродных нанотрубок: синтез, свойства и применение фотрированных производных // Успехи химии. 2011. Т. 80. Вып. 8. С. 739-760.
52. Халлиулин Т.О., Кисин Е.Р., Залялов Р.Р., Шведова А.А., Фатхутдинова Л.М. Биологические эффекты многослойных углеродных нанотрубок при легочной экспозиции *in vivo* // Токсикологический вестник. 2013. №4. С. 17-21.
53. Хоружая Е.Ю., Джикия А.А. Адаптация механизма развития nanoиндустрии РФ к условиям неблагоприятной внешней среды // Инновационная экономика: перспективы развития и совершенствования, 2018. №6 (32). С. 229-237.
54. Abarrategi A., Gutiérrez M.C., Moreno-Vicente C., Hortigüela M. J., Ramos V., López-Lacomba J. L., Ferrer M. L., del Monte F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes // Biomaterials. 2008. Vol. 29. P. 94-102.
55. Abdel-Aziz H.M.M., Hasaneen M.N.A., Omer A.M. Impact of engineered nanomaterials either alone or loaded with NPK on growth and productivity of French bean plants: Seed priming vs foliar application // South African Journal of Botany. 2019. Vol. 125. P. 102-

- 108.
56. Adeyemi S., Adeleye C., Kay T. Ho, Min Zhang, Yao Li, Robert M. Burgess P. Fate and Transformation of Graphene Oxide in Estuarine and Marine Waters // *Environmental Science & Technology*. 2019. Vol. 53 (10). P. 5858-5867.
57. Agathokleous E., Feng Z., Iavicoli I., Calabrese E.J. Nano-pesticides: A great challenge for biodiversity? The need for a broader perspective // *Nano Today*. 2020. Vol. 30. P. 100-108.
58. Al-Subiai S. N., Arlt V. M., Frickers P. E., Readman J. W., Stolpe B., Lead J. R., Moody A. J., Jha A. N. Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: An integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C60 fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. // *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012. Vol. 745. P. 92-103.
59. Allen B.L., Kichambare P.D., Gou P., Vlasova I.I., Kapralov A.A., Konduru, N., Kagan V.E., Star A. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis // *Nano Letters*. 2008. Vol. 8. Issue 11. P. 3899-3903.
60. Alex S, Tiwari A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications-A Review // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2015. Vol. 15 P.89-94.
61. Ali D., Alarifi S., Kumar S., Ahamed M., Siddiqui M.A. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. // *Aquatic Toxicology*. 2012. Vol. 124, P. 83-90.
62. Ali, D., Yadav P. G., Kumar S., Ali H., Alarifi S., Harrath A. H. Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L., to silver nanoparticles // *Chemosphere*. 2014. Vol. 104. P. 134-140.
63. Amaral do D.F., Guerra V., Motta A.G.C., de Melo e Silva D., Rocha T.L. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 686. P. 332-344
64. Amde M., Liu J.-f., Tan Z.-Q., Bekana D. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. // *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 230. P. 250-267.

65. Andón F.T., Kapralov A.A., Yanamala N., Feng W., Baygan A., Chambers B.J., Hulthenby K., Ye F., Toprak M.S., Brandner B.D., Fornara A., Klein-Seetharaman J., Kotchey G.P., Star A., Shvedova A.A., Fadeel B., Kagan V.E. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes by eosinophil peroxidase // *Small*. 2013. Vol. 9. Issue 16. P. 2721-2729.
66. Anisimova A. Flow cytometric and light microscopic identification of hemocyte subpopulations in *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) (Bivalvia: Mytilidae) // *Russian Journal of Marine Biology*. 2012. Vol. 38. N 5. P. 406-415.
67. Anisimova A., Russ. J. Morphofunctional parameters of hemocytes in assessment of the physiological status of bivalves // *Marine Biology*. 2013. Vol. 39. P. 381–391.
68. Anisimova A.A., Chaika V.V., Kuznetsov V.L., Golokhvast K.S. Study of the influence of multi-walled carbon nanotubes (12–14 nm) on the main target tissues of the bivalve *Modiolus modiolus* // *Nanotechnol. Russia*. 2015. Vol. 10. P. 278-287.
69. Anisimova A.A., Lukyanova O.N., Chaika V.V., Kalitnik A.A., Danilenko S.A., Kuznetsov V.L. Short-Time Effect of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Some Histological and Biochemical Parameters in Marine Bivalves *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) and *Swiftopecten swifti* (Bernardi, 1858) // *Nano Hybrids and Composites*. 2017. Vol. 13. P. 225-31.
70. Arlt C.-R., Tschöpe A., Franzreb M. Size fractionation of magnetic nanoparticles by magnetic chromatography // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2020. Vol. 497. P. 59-67.
71. Arora S., Jain J., Rajwade J. M., Paknikar K. M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells // *Toxicology and applied pharmacology*. 2009. Vol. 236. P. 310-318.
72. Arora S., Rajwade J.M., Paknikar K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012. Vol. 258. Issue 2. P. 151-165.
73. Aruoja V., Sihtmäe M., Kahru A. Toxicity of metallic nanoparticles to algae is mediated by agglomeration and reactive oxygen species formation // *Toxicology letters*. 2015. Vol. 238(2) P. 51-58.
74. Aschberger K., Johnston J. Review of fullerene toxicity and exposure--appraisal of a human health risk assessment, based on open literature // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010.

Vol. 58. P. 55-73.

75. Bacchetta C., Ale A., Simoniello M.F., Gervasio S., Davico C., Rossi A.S., Desimone M.F., Poletta G., López G., Monserrat J.M., Cazenave J. Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles // *Ecological Indicators*. 2017. Vol. 76. P. 230-239.
76. Balbi T., Camisassi G., Montagna M., Fabbri R., Franzellitti S., Carbone C., Dawson K., Canesi L. Impact of cationic polystyrene nanoparticles (PS-NH₂) on early embryo development of *Mytilus galloprovincialis* // *Effects on shell formation*. *Chemosphere*. 2017. Vol. 186. P. 1-9.
77. Balogh L., Nigavekar S.S., Nair B.M., Lesniak W., Zhang C., Sung L.Y., Kariapper M.S., El-Jawahri A., Llanes M., Bolton B., Mamou F., Tan W., Hutson A., Minc L., Khan M.K. Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models // *Nanomedicine*. 2007. Vol. 3(4). P. 281-96.
78. Bao S., Huang M., Tang W., Wang T., Xu J., Fang T. Opposite effects of the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of Zn in soils amended with ZnO and ZnS nanoparticles // *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 260. № 11. P. 40-45.
79. Bao S., Tang W., Fang T. Sex-dependent and organ-specific toxicity of silver nanoparticles in livers and intestines of adult zebrafish // *Chemosphere*, 2020b. Vol. 249. P. 61-72
80. Barbalinardo M., Caicci F., Cavallini M., Gentili D. Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast // *Small*. 2018. Vol. 14 (34). P. 12-19.
81. Bardi G., Tognini P., Ciofani G., Raffa V., Costa M., Pizzorusso T. Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro. *Nanomedicine // Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009. Vol.5. P. 96-104.
82. Barreto A., Dias A., Duarte B., Pinto E., Almeida A., Trindade T., Soares A.M.V.M., Hylland K., Loureiro S., Oliveira M. Biological effects and bioaccumulation of gold in gilthead seabream (*Sparus aurata*) – Nano versus ionic form // *Science of the Total environment*. 2020. Vol. 716. P. 37-44
83. Barrick A, Manier N, Lonchambon P, Flahaut E, Jradd N, Mouneyrac C. Investigating a transcriptomic approach on marine mussel hemocytes exposed to carbon nanofibers: An

- in vitro/in vivo comparison // *Aquatic Toxicology*. 2019. Vol. 207. P. 19-28.
84. Barkalina, N., Jones C., Kashir J., Coote S., Huang X., Morrison R., Townley H. Effects of mesoporous silica nanoparticles upon the function of mammalian sperm in vitro // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014. Vol. 10. P. 859-870.
 85. Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López-Quintela M.A. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin // *Journal of Investigative Dermatology*. 2007. Vol. 127. Issue 7. P. 1701-1712
 86. Behl B., Papageorgiou I., Brown C., Hall R., Tipper J. L., Fisher J., Ingham E. Biological effects of cobalt-chromium nanoparticles and ions on dural fibroblasts and dural epithelial cells // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34. P. 3547-3558.
 87. Benjamin MM. Water chemistry // *Waveland Press*. 2014. Vol. 79 (1). P. 209-221
 88. Bhattacharya K., Andón F. T., El-Sayed R., Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013. Vol. 65. P. 2087-2097.
 89. Bicho R.C., Roelofs D., Mariën J., Scott-Fordsmand J.J., Amorim M.J.B. Epigenetic effects of (nano)materials in environmental species – Cu case study in *Enchytraeus crypticus* // *Environment International*. 2020. Vol. 136. P. 54-63.
 90. Bishop G.M., Dringen R., Robinson S.R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes // *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. Vol. 42. № 12. P. 22-30.
 91. Boelter J.F., Brandelli A., Meira S.M.M., Göethel G., Garcia S.C. Toxicology study of nanoclays adsorbed with the antimicrobial peptide nisin on *Caenorhabditis elegans* // *Applied Clay Science*. 2020. Vol. 188. № 10. P. 54-90.
 92. Bondarenko O., Ivask A., Käkinen A., Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action // *Environmental Pollution*. 2012. Vol. 169. P. 81-89.
 93. Borm P.J.A. Particle toxicology: From coal mining to nanotechnology // *Inhalation Toxicology*. 2002. Vol 14 (3). P. 311-324.
 94. Brown J.E., Kolstad A.K., Brungot A.L., Lind B., Rudjord A.L., Strand P., Foyn L. Levels of Tc-99 in seawater and biota samples from Norwegian coastal waters and adjacent

- seas // *Marine Pollution Bulletin*. 1999. Vol. 38. P. 560-571.
95. Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K. Size-dependent pro-inflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001. Vol. 175 (3). P. 191-199.
 96. Buffet P.-E., Amiard-Triquet C., Dybowska A., Risso-de Faverney C., Guibbolini M., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. Fate of isotopically labeled zinc oxide nanoparticles in sediment and effects on two endobenthic species, the clam *Scrobicularia plana* and the ragworm *Hediste diversicolor* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012. Vol. 84. P. 191-198.
 97. Cai Q., Subramani K., Mathew R., Yang X. Carbon Nanomaterials for Implant Dentistry and Bone Tissue Engineering // In *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry 2013*. Vol. 18. P. 359-388.
 98. Calder, A. J., Dimkpa C. O., McLean J. E., Britt D. W., Johnson W., Anderson A. J. Soil components mitigate the antimicrobial effects of silver nanoparticles towards a beneficial soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6 // *Science of The Total Environment*. 2012. Vol. 429. P. 215-222.
 99. Camisasca A., Giordani S. Carbon nano-onions in biomedical applications: Promising theranostic agents. // *Inorganica Chimica Acta*. 2017. Vol. 468. P. 67-76.
 100. Canesi L., Fabbri R., Gallo G., Vallotto D. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂) // *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 100. N 2. P. 68-77.
 101. Canesi, L., Ciacci C., Fabbri R., Balbi T., Salis A., Damonte G., Cortese K., Caratto V., Monopoli M. P., Dawson K., Bergami E., Corsi I. Interactions of cationic polystyrene nanoparticles with marine bivalve hemocytes in a physiological environment: Role of soluble hemolymph proteins // *Environmental Research*. 2016. Vol. 150. P. 73-81.
 102. Canesi L, Ciacci C, Betti M, Fabbri R, Canonico B, Fantinati A. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes // *Environment international*. 2008. Vol. 34. № 11. P. 14-19.
 103. Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G. Bivalve molluscs as a

- unique target group for nanoparticle toxicity // *Marine Environmental Research*. 2012. Vol. 76. P. 16-21.
104. César M., Barbeiro D F, Koike M K. Intestinal barrier dysfunction and increased COX-2 gene expression in the gut of elderly rats with acute pancreatitis // *Pancreatology*. 2016. Vol. 16. N 1. P. 52-6.
105. Chen Y., Yang L., Feng C. Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 337. P. 52–60.
106. Chen, T., Yan J., Li Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles // *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014. Vol. 22. P. 95-104.
107. Chen X., Zhang C., Tan L., Wang J. Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 236. P. 454-461.
108. Cheng L., Xiang Q.J., Liao Y.L., Zhang H.W. CdS-Based photocatalysts // *Energy & Environmental Science*. 2018. Vol. 11. P. 62-71.
109. Chithrani D.B. Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures // *Mol. Membr. Biol.* 2010. Vol. 27(7). P. 299-311.
110. Cho M., Cho W.-S., Choi M., Kim S. J., Han B. S., Kim S. H., Kim H. O., Sheen Y. Y., Jeong J. The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles // *Toxicology Letters*. 2009. Vol. 189. P. 177-183.
111. Cho W.-S., Cho M., Jeong J., Choi M., Cho H.-Y., Han B. S., Kim S. H., Kim H. O., Lim Y. T., Chung B. H., Jeong J. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009. Vol. 236. P. 16-24.
112. Choi J. E., Kim S., Ahn J. H., Youn P., Kang J. S., Park K., Yi J., Ryu D.-Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish // *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 100. P. 151-159.
113. Cicchetti, R., Divizia M., Valentini F., Argentin G. Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: Geno-cytotoxic risk // *Toxicology in Vitro*. 2011. Vol. 25. P. 1811-1819.
114. Cimen I.C.C., Danabas D., Ates M. Comparative effects of Cu (60–80 nm) and CuO

- (40 nm) nanoparticles in *Artemia salina*: Accumulation, elimination and oxidative stress // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 717. P. 137-145.
115. Clément L, Hurel C, Marmier N. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure // *Chemosphere*. 2013. Vol. 90. P. 83-90.
116. Cunningham C., Sanderson J. Systemic inflammation induces acute working memory deficits in the primed brain: relevance for delirium // *Neurobiol Aging*. 2012. Vol. 33(3). P. 603–616.
117. Cox L.M., Martinez A.M., Blevins A.K., Sowan N., Ding Y., Bowman C.N. Nanoimprint lithography: Emergent materials and methods of actuation // *Nano Today*. 2020. P. 103- 111
118. Cui B., Ren L., Xu Q.-H., Yin L.-Y., Zhou X.-Y., Liu J.-X. Silver nanoparticles inhibited erythropoiesis during zebrafish embryogenesis // *Aquatic Toxicology*. 2016. Vol. 177. P. 295-305.
119. Culcasi M., Benameur L., Mercier A., Lucchesi C., Rahmouni H., Asteian A., Casano G., Botta A., Kovacic H., Pietri S. EPR spin trapping evaluation of ROS production in human fibroblasts exposed to cerium oxide nanoparticles: Evidence for NADPH oxidase and mitochondrial stimulation // *Chemico-Biological Interactions*. 2012. Vol. 199. P. 161-176.
120. Dabour K., Al Naggar Y., Masry S., Naiem E., Giesy J.P. Cellular alterations in midgut cells of honey bee workers (*Apis mellifera* L.) exposed to sublethal concentrations of CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 651. P. 1356-1367
121. Danilenko S.A., Lukyanova O.N. Molecular biomarkers of the physiological state of mitten crab *Eriocheir japonica* (deHaan, 1835) in the estuarine zones of Peter the Great Bay (Sea of Japan) // *Inland Water Biol*. 2014. Vol. 73. P. 264-272.
122. Das S., Singh S., Dowding J. M., S. Oommen S., Kumar A., Sayle T. X. T., Saraf S., Patra C. R., Vlahakis N. E., Sayle D. C., Self W. T., Seal S. The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. P. 7746-7755.
123. Davarpanah E., Guilhermino L. Are gold nanoparticles and microplastics mixtures

- more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually? // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Vol. 181. P. 60-68.
124. De Berardis B., Civitelli G., Condello M., Lista P., Pozzi R., Arancia G., Meschini S. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010. Vol. 246. P. 116-127.
125. Delfino R.J., Sioutas C., Malik S. Potential Role of Ultrafine Particles in Associations between Airborne Particle Mass and Cardiovascular Health // *Environ Health Perspect.* 2005. Vol. 113(8). P. 934–946.
126. De Marchi L., Neto V., Pretti C., Figueira E., Chiellini F., Soares A. M. V. M., Freitas R. The impacts of emergent pollutants on *Ruditapes philippinarum*: biochemical responses to carbon nanoparticles exposure // *Aquatic Toxicology* 2017. Vol. 187. P. 38-47.
127. De Marchi L., Coppola F., Soares A., Pretti C., Monserrat J.M., della Torre C. Engineered nanomaterials: From their properties and applications, to their toxicity towards marine bivalves in a changing environment // *Environmental Research*. 2019. Vol. 178. P. 234–246.
128. Deyrieux A.F., Wilson V.G. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line // *Cytotechnology*. 2007. Vol. 54. P. 77-83.
129. Díaz E., Ordóñez S., Vega A. Adsorption of volatile organic compounds onto carbon nanotubes, carbon nanofibers, and high-surface-area graphites // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007. Vol. 305. P. 7-16.
130. Dienz O., Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses // *Clin Immunol.* 2009 Jan. Vol. 130(1). P. 27-33.
131. Dick C.A., Singh P., Daniels M., Evansky P., Becker S., Gilmour M.I. Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter // *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2003. Vol. 66(23). P. 2193-2207
132. Dimcheva N. Nanostructures of noble metals as functional materials in biosensors // *Current Opinion in Electrochemistry*. 2020. Vol. 19. P. 35-41.
133. Dinnel P.A. Evolution and present status of the sea urchin sperm test // *Russian Journal of Marine Biology*. 1995. Vol. 21: P. 344-350.
134. Donaldson K., Stone V., Tran C.L., Kreyling W., Borm P.J.A. A new frontier in particle

- toxicology relevant to both the workplace and general environment and to consumer safety
Nanotoxicology // Occupational and Environmental Medicine. 2004. Vol. 61. P. 727-728.
135. Docea, A.O. Six months exposure to a real life mixture of 13 chemicals' below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats // Food and Chemical Toxicology. 2018. Vol. 115: P. 470-481.
136. Dong P.-X., Song X., Wu J., Cui S., Wang G., Zhang L., Sun H. The Fate of SWCNTs in Mouse Peritoneal Macrophages: Exocytosis, Biodegradation, and Sustainable Retention // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020. Vol. 8. P. 36–46.
137. Dowling M.B., Li L., Park J., Kumi G., Nan A., Ghandehari H., Fourkas J.T., DeShong P. Multiphoton-absorption-induced-luminescence (MAIL) imaging of tumor-targeted gold nanoparticles // Bioconjugation Chemistry. 2010. Vol. 21(11). P. 68-77.
138. Drew K.M., Ross R. Some generic names in the Bangiophycidae // Taxon. 1965. Vol. 14. P. 93-99.
139. Duan J., Yu Y., Li Y., Yu Y., Sun Z. Cardiovascular toxicity evaluation of silica nanoparticles in endothelial cells and zebrafish model // Biomaterials. 2013. Vol. 34. P. 5853-5862.
140. Duester L., Fabricius A.-L., Jakobtorweihen S., Philippe A., Weigl F., Wimmer A., Schuster M., Nazar M.F. Can cloud point-based enrichment, preservation, and detection methods help to bridge gaps in aquatic nanometrology? // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2016. 408 (27). P. 7551-7557.
141. Ejima H., Richardson J.J., Caruso F. Metal-phenolic networks as a versatile platform to engineer nanomaterials and biointerfaces // Nano Today. 2017. Vol. 12. P. 136-148.
142. Elder J.B., Chen T.C. Surgical interventions for primary central nervous system lymphoma // Neurosurg Focus. 2006. Vol. 21(5). P. 130-138.
143. Elenkov I J., Wilder R L., Chrousos G P., Vizi E S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system // Pharmacol Review. 2000. Vol. 52(4). P. 595-638.
144. El-Shazoly R.M., Amro A. Comparative physiological and biochemical effects of CuO NPs and bulk CuO phytotoxicity onto the maize (*Zea mays*) seedlings // Global Nest Journal. 2019. Vol. 21. Issue 3. P. 276-289.

145. Engin A.B., Neagu M., Nikitovic D., Henrich-Noack P., Docea A.O., Shtilman M.I. Golokhvast K.S., Tsatsakis A.M. Mechanistic understanding of nanoparticles' interactions with extracellular matrix: The cell and immune system // *Particle and Fibre Toxicology*. 2017. Vol. 14. P. 22-27.
146. Eom H.-J., Choi J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B // *Toxicology in Vitro*. 2009. Vol. 23. P. 1326-1332.
147. Evariste L., Mottier A., Lagier L., Cadarsi S., Barret M., Sarrieu C., Soula B., Mouchet F., Flahaut E., Pinelli E., Gauthier L. Assessment of graphene oxide ecotoxicity at several trophic levels using aquatic microcosms // *Carbon*. 2020. Vol. 156. P. 261-271.
148. Fan W., Liu L., Peng R., Wang W.-X. High bioconcentration of titanium dioxide nanoparticles in *Daphnia magna* determined by kinetic approach // *Science of The Total Environment*. 2016. Vol. 569. P. 1224-1231.
149. Felger J C, Lotrich E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications // *Neuroscience*. 2013. Vol. 246. P. 199-229.
150. Figarol A., Pourchez J., Boudard D., Forest V., In vitro toxicity of carbon nanotubes, nano-graphite and carbon black, similar impacts of acid functionalization // *Toxicology in Vitro*. 2015. P. 76-85.
151. Filippi C., Pryde A., Cowan P., Lee T., Hayes P., Donaldson K., Plevris J., Stone V. Toxicology of ZnO and TiO₂ nanoparticles on hepatocytes: Impact on metabolism and bioenergetics // *Nanotoxicology*. 2015. Vol. 9. Issue 1. P. 126-134.
152. Fincheira P., Tortella G., Duran N., Seabra A.B., Rubilar O. Current applications of nanotechnology to develop plant growth inducer agents as an innovation strategy // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2020. Vol. 40. Issue 1. P. 15-30.
153. Foldvari M., Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2008. Vol. 4. P. 183-200.
154. Fraczek-Szczypta A. Carbon nanomaterials for nerve tissue stimulation and regeneration // *Materials Science and Engineering*. 2014. Vol. 34. P. 35-49.
155. Frank E.A., Carreira V.S., Shanmukhappa K., Medvedovic M., Prows D.R., Yadav J.S. Genetic susceptibility to toxicologic lung responses among inbred mouse strains following

- exposure to carbon nanotubes and profiling of underlying gene networks // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017. Vol. 327. P. 59-70.
156. Frank B.P., Sigmon L.R., Deline A.R., Lankone R.S., Gallagher M.J., Zhi B., Christy L. Haynes, D. Fairbrother H. Photochemical Transformations of Carbon Dots in Aqueous Environments // *Environmental Science & Technology*. 2020. Vol. 54 (7). P. 4160-4170.
157. Freixa A., Acuña V., Àngel J., Farré M. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 619: P. 328-337.
158. Fubini B., Ghiazza M., Fenoglio I. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity // *Nanotoxicology*. 2010 P. 47-63
159. Gagnè F., Auclair J., Turcotte P. Ecotoxicity of Cd-Te quantum dots to freshwater mussel: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity // *Aquatic Toxicology*. 2008. Vol. 86. P. 333–340.
160. Gagné F., André R., Skirrow M., Gélinas J. Auclair G. van Aggelen P. Turcotte O., Gagnon C. Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: A toxicogenomic approach // *Chemosphere*. 2012. Vol. 89. P. 615-622.
161. Gallo A., Manfra L., Boni R., Rotini A., Migliore L. Tosti E. Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress // *Environment International*. 2018. Vol 118. P. 325-333.
162. Gamer A.O., Leibold E., van Ravenzwaay B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin // *Toxicology in Vitro*. 2006. Vol. 20(3). P. 301-307.
163. García A., Espinosa R., Delgado L., Casals E., González E., Puntos V., Barata C., Font X., Sánchez A. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests // *Desalination*. 2011. Vol. 269. P. 136-141.
164. García-Gómez C., Babín M., García S., Almendros P., Pérez R.A., Fernández M.D. Joint effects of zinc oxide nanoparticles and chlorpyrifos on the reproduction and cellular stress responses of the earthworm *Eisenia Andrei* // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 688. P. 199-207.
165. Gattoo M.A., Naseem S., Arfat M.Y., Dar A.M., Qasim K., Zubair S. Physicochemical

- properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations // Biomedical Research International. 2014. Vol. 2014. P. 409-420.
166. Gebara R.C., Souza J.P., Mansano A.D.S., Sarmiento H., Melão M.D.G.G. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on life history and metabolism of the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019. Vol. 186. P. 209-213
167. Giannetto, A., T. Cappello S. Oliva V. Parrino G. De Marco S. Fasulo A. Mauceri X., Maisano M. Copper oxide nanoparticles induce the transcriptional modulation of oxidative stress-related genes in *Arbacia lixula* embryos // Aquatic Toxicology. 2018. Vol. 201. P. 187-197.
168. Ging J., Tejerina-Anton R., Ramakrishnan G., Nielsen M., Murphy K., Gorham J. M., Nguyen T., Orlov A. Development of a conceptual framework for evaluation of nanomaterials release from nanocomposites: Environmental and toxicological implications // Science of The Total Environment. 2014. Vol. 473. P. 9-19.
169. Girardello F., Custódio C., Leite I. Vianna V., da Silva Machado M., Luiz Mendes A., Juchem M., Roesch-Ely A., Fernandes N., Salvador M., Antonio J. Henriques P. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortuna* // Aquatic Toxicology. 2016. Vol. 170. P. 223-228.
170. Girardello F., Leite C. C., Branco C. S., Roesch-Ely M., Fernandes A. N., Salvador M. Henriques J. A. P. Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles // Aquatic Toxicology. 2016. Vol. 176. P. 190-196.
171. Ghosh M., Ghosh I., Godderis L., Hoet P., Mukherjee A. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants // Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019. Vol. 842. P. 132-145.
172. Golokhvast K.S., Panichev A.M., Chekryzhov I.Yu O., Kusaikin M.I. A method of comminuting natural zeolite for the production of biologically active additives // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2010. Vol. 44. №2. P. 85-88.
173. Golokhvast K.S., Chaika V.V., Kuznetsov L.V., Elumeeva K.V., Kusaikin M.I., Zakharenko A.M., Kiselev N.N., Panichev A.M., Reva G.V., Usov V.V., Reva I.V., Yamamoto T., Gul'kov A.N. Effects of multi walled carbon nanotubes received orally during 6 days on

- the gastrointestinal tract // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. Vol. 155 (6). P. 788–792.
174. Golokhvast K., Sergievich A., Grigoriev N. Geophagy (rock eating), experimental stress and cognitive idiosyncrasy // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2014. №4. P. 362-366.
175. Golokhvast K.S., Chernyshev V.V., Chaika V.V., Ugay S.M., Zelinskaya E.V., Tsatsakis A.M., Karakitsios S.P., Sarigiannis D.A. Size-segregated emissions and metal content of vehicle-emitted particles as a function of mileage: implications to population exposure // Environ. Res. 2015. Vol. 142. P. 479–485
176. Galimany A. R. Place M. Ramón. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis* // Harmful Algae. 2008. Vol. 7 (1). P. 91–98.
177. Gomes E., Florida-James D. Lung Inflammation, Oxidative Stress and Air Pollution // Chapter (PDF Available). 2014. Vol. 3 (1). P. 156–160.
178. Gong N., Shao K., Che C., Sun Y. Stability of nickel oxide nanoparticles and its influence on toxicity to marine algae *Chlorella vulgaris* // Marine Pollution Bulletin. 2019. Vol. 149. P. 110-119.
179. Grigoriev N.R., Kirichenko E.F., Temper Yu.B., Cherbikova G.E. Dynamics of the integral parameters of exploratory behavior and searching activity in the experimental situation in rats // Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I.P. Pavlova. 1998. Vol. 48(5). P. 875-876.
180. Grigor'ev N.R., Batalova T.A., Kirichenko E.F., Sergievich A.A., Cherbikova G.E. Typological features in the behavior of rats // Neurosci. Behav. Physiol. 2008. Vol. 38. P. 597-603.
181. Guillard R.R., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // Canadian Journal of Microbiology. 1962. Vol. 8. P. 229–239.
182. Guo D., Bi H., Liu B., Wu Q., Wang D., Cui Y. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells // Toxicology *in Vitro*. 2013. Vol. 27. P. 731-738.
183. Guseva Canu I., Bateson T. F., Bouvard V., Debia M., Dion C., Savolainen K., Yu I.-J. Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials // International Journal of Hygiene

- and Environmental Health. 2016. Vol. 219. P. 166-175.
184. Hadrup N., Lam H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014. Vol. 68. P. 1-7.
 185. Hajiabadi S.H., Aghaei H., Kalateh-Aghamohammadi M., Shorgasthi M. An overview on the significance of carbon-based nanomaterials in upstream oil and gas industry // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2020. Vol. 186. P. 67-83
 186. Hall C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // *J. Comp. Psychol.* 1934. Vol. 18. P. 385–403.
 187. Hall C.S. Emotional behavior in the rat: III. The relationship between emotionality and ambulatory activity // *J. Comp. Psychol.* 1936. Vol. 22. P. 345–452.
 188. Hamilton R. F., Thakur S. A., Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages // *Free Radical Biology and Medicine*. 2008. Vol. 44. P. 1246-1258.
 189. Hao L., Chen L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012. Vol. 80. P. 103-110.
 190. Hao L., Wang Z., Xing B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) // *Journal of Environmental Sciences*. 2009. Vol. 21. P. 1459-1466.
 191. Hara Y., Chihara M. Morphology, ultrastructure and taxonomy of the raphidophycean alga *Heterosigma-Akashiwo* // *Botanical Magazine-Tokyo*. 1987. Vol. 100. P. 151-163.
 192. Harrison B. S. Atala A. Carbon nanotube applications for tissue engineering // *Bio-materials*. 2007. Vol. 28. P. 344-353.
 193. Hernández A.F. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage // *Food and Chemical Toxicology*. 2013. Vol. 61. P. 144-151.
 194. Haynes V.N., Ward J.E., Russell B.J., Agrios A.G. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms Current knowledge and suggestions for future research // *Aquatic Toxicology*. 2017. Vol. 185. P. 38-48.
 195. He S., Feng Y., Gu N., Zhang Y., Lin X. The effect of γ -Fe₂O₃ nanoparticles on *Escherichia coli* genome // *Environmental Pollution*. 2011. Vol. 159. P. 3468-3473.

196. He S., Feng Y., Ni J., Sun Y., Xue L., Feng Y., Yu Y., Lin X., Yang L. Different responses of soil microbial metabolic activity to silver and iron oxide nanoparticles // *Chemosphere*. 2016. Vol. 147. P. 195-202.
197. Heckert E. G., Karakoti A. S., Seal S., Self W. T. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29. P. 2705-2709.
198. Heinlaan M., A. Ivask I. Blinova H., Dubourguier C., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* // *Chemosphere*. 2008. Vol. 71. P. 1308-1316.
199. Henrich-Noack P. Please keep calm: investigating hippocampal function without stress // *Frontiers of Behavior Neuroscience*. 2014. Vol. 8. P. 356-362.
200. Himmerich H., Bartsch S. Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro / *Journal of Psychiatric Research*. 2013. Vol. 47(11). P. 451-456.
201. Hirano S., Fujitani Y., Furuyama A., Kanno S. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010. Vol. 249. P. 8-15.
202. Henry M. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future // *Animal Feed Science and Technology*. 2015. Vol. 203: P. 1-22.
203. Hodge H., Sterner J. Tabulation of toxicity classes // *Am. Ind. Hyg. Assoc. Q.* 1949. Vol. 10(4). P. 93-96.
204. Hofmann-Antenbrink M., Grainger D. W., Hofmann H. Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015. Vol. 11. P. 1689-1694.
205. Hoshino A., Hanada S., Yamamoto K. Toxicity of nanocrystal quantum dots: the relevance of surface modifications // *Archives of Toxicology*. 2011. Vol. 85. P. 86-92.
206. Hou W.-C., Chowdhury I., Goodwin D.G., Henderson Jr. W. M., Fairbrother D.H., Bouchard D., Zepp R.G. Photochemical transformation of graphene oxide in sunlight // *Environ. Sci. Technol.* 2015. Vol. 49 (6). P. 3435-3443.
207. Hou J., Wan B., Yang Y., Ren X.-M., Guo L.-H., Liu J.-F. Biodegradation of Single-Walled Carbon Nanotubes in Macrophages through Respiratory Burst Modulation // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17(3). P. 409-414.

208. Hsiao I. L., Huang Y.-J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells // *Science of the Total Environment*. 2011. Vol. 409. P. 1219-1228.
209. Hu J., Wang J., Liu S., Zhang Z., Zhang H., Cai X., Pan J., Liu J. Effect of TiO₂ nanoparticle aggregation on marine microalgae *Isochrysis galbana* // *Journal of Environmental Sciences*. 2018. Vol. 66. P. 208-215.
210. Huang X., Zhang F., Sun X., Choi K.-Y., Niu G., Zhang G., Guo J., Lee S., Chen X. The genotype-dependent influence of functionalized multiwalled carbon nanotubes on fetal development // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35. P. 856-865.
211. Hussain S.M., Javorina A.K., Schrand A.M., Duhart H.M., Ali S.F., Schlager J.J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion // *Toxicol. Sci*. 2006. Vol. 92. P. 456-463.
212. Inoue K.-i., Koike E., Yanagisawa R., Hirano S., Nishikawa M., Takano H. Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009. Vol. 237. P. 306-316.
213. Isani G., Falcioni M. L., Barucca G., Sekar D., Andreani G., Carpenè E., Falcioni G. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013. Vol. 97. P. 40-46.
214. Jasim B., Thomas R., Mathew J., Radhakrishnan E. K. Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017. Vol. 25. P. 443-447.
215. Jiang Y., Raliya R., Fortner J.D., Biswas P. Graphene Oxides in Water: Correlating morphology and surface chemistry with aggregation behavior // *Environmental Science & Technology*. 2016. Vol. 50(13). P. 6964-6973.
216. Jo D.H., Kim J.H., Lee T.G., Kim J.H. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015. Vol. 11. P. 1603-1611.
217. Jordan J. T., Singh K.P., Cañas-Carrell J.E. Carbon-based nanomaterials elicit changes in physiology, gene expression, and epigenetics in exposed plants: A review // *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2018. Vol. 6. P. 29-35.

218. Ivkovic S., Deutsch U., Silberbach A., Walraph E., Mannel M. Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system // *Adv. Ther.* 2004. № 21(2). P. 135–147.
219. Kafa H., Wang J.T.-W., Rubio N., Klippstein R., Costa P.M., Hassan H.A.F.M., Sosabowski J.K., Bansal S.S., Preston J. E., Abbott N.J., Al-Jamal K.T. Translocation of LRP1 targeted carbon nanotubes of different diameters across the blood–brain barrier in vitro and in vivo // *Journal of Controlled Release.* 2016. Vol. 225. P. 217-229.
220. Kagan V.E., Konduru N.V., Feng W., Allen B.L., Conroy J., Volkov Y., Vlasova I.I., Belikova N.A., Yanamala N., Kapralov A., Tyurina Y.Y., Shi J., Kisin E.R., Murray A.R., Franks J., Stolz D., Gou P., Klein-Seetharaman J., Fadeel B., Star A., Shvedova A.A. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation // *Nature Nanotechnology.* 2010. Vol. 5. Issue 5. P. 354-359.
221. Kagan V.E., Kapralov A.A., Croix C.M.St., Watkins S.C., Kisin E.R., Balasubramanian K., Vlasova I.I., Kim J.Y.K., Mallampalli R.K., Star A., Shvedova A.A. Lung macrophages digest carbon nano- tubes using a superoxide/peroxynitrite oxidative pathway // *ACS Nano.* 2014. V. 8. Issue 6. P. 5610-5621.
222. Katsumiti A., Arostegui I., Oron M., Gilliland D., Valsami-Jones E., Cajaraville M.P. Cytotoxicity of Au, ZnO and SiO₂ NPs using in vitro assays with mussel hemocytes and gill cells: Relevance of size, shape and additives // *Nanotoxicology.* 2016. Vol. 10. P. 185-93.
223. Kayat J., Gajbhiye V., Tekade R.K., Jain N.K. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2011. Vol. 7. P. 40-49.
224. Ke M., Li Y., Qu Q., Ye Y., Peijnenburg W.J.G.M., Zhang, Z., Xu N., Lu T., Sun L., Qian H. Offspring toxicity of silver nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* flowering and floral development // *Journal of Hazardous Materials.* 2020. Vol. 386. P. 120-129.
225. Kesharwani P., Ghanghoria R., Jain N.K. Carbon nanotube exploration in cancer cell lines // *Drug Discovery Today.* 2012. Vol. 17. P. 1023-1030.
226. Kibbey T.C.G., Strevett K.A. The effect of nanoparticles on soil and rhizosphere bacteria and plant growth in lettuce seedlings // *Chemosphere.* 2019. Vol. 221. P. 703-707.

227. Kim K. T., Klaine S. J., Cho J., Kim S.-H., Kim S. D. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction // *Science of the Total Environment*. 2010. Vol. 408. P. 2268-2272.
228. Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited // *Journal of Physical Chemistry B*. 2006. Vol. 110. P. 157-165.
229. Kiranmai G., Reddy A. Antioxidant status in MgO nanoparticle-exposed rats // *Toxicology and Industrial Health*. 2012. Vol. 29(10). P. 264-272.
230. Kirichenko K.Y., Drozd V.A., Chaika V.V., Gridasov A.V., Kholodov A.S., Golokhvast K.S. Nano- and microparticles in welding aerosol: granulometric analysis // *Phys. Procedia*. 2017. Vol. 86. P. 50–53.
231. Kirichenko K.Y., Drozd V.A., Gridasov A.V., Koblyakov S.P., Kholodov A.S., Chaika V.V., Golokhvast K.S., 3D-Modeling of the distribution of welding aerosol nano- and microparticles in the working area // *Nano Hybrids Composition*. 2017. Vol. 13. P. 232–238.
232. Koehler A., Marx U., Broeg K. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – a new threat to marine life? // *Marine Environment*. 2008. Vol. 66. P. 12–14.
233. Kögel T., Bjørøy Ø., Toto B., Bienfait A.M., Sanden M. Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 709. P. 226-232.
234. Kotchey G.P., Hasan S.A., Kapralov A.A. A natural vanishing act: The enzymecatalyzed degradation of carbon nanomaterials // *Accounts of Chemical Research*. 2012. V. 45. Issue 10. P. 1770-1781.
235. ozelskaya A. I., Panin A. V., Khlusov I. A., Mokrushnikov P. V., Zaitsev B. N., Kuzmenko D. I., Vasyukov G. Y. Morphological changes of the red blood cells treated with metal oxide nanoparticles // *Toxicology in Vitro*. 2016. Vol. 37. P. 34-40.
236. Kreyling W.G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H., Oberdörster G., Ziesenis A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium

- to extrapulmonary organs is size dependent but very low // *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2002. Part A: Current Issues. 65:20. P. 1513-1530
237. Kubackova J., Zbytovska J., Holas O. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 142. P. 105-109.
238. Kubota M., Nakabayashi T., Matsumoto Y., Shiomi T., Yamada Y., Ino K., Yamanouchi H., Matsui M., Tsunoda T., Mizukami F., Sakaguchi K. Selective adsorption of bacterial cells onto zeolites // *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2008. № 64. P. 88–97.
239. Kumar N., Shah V., Walker V. K. Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles // *Journal of Hazardous Materials*. 2011. Vol. 190. P. 816-822.
240. Kunzmann A., Andersson B., Vogt C., Feliu N., Ye F., Gabrielsson S., Toprak M. S., Buerki-Thurnherr T., Laurent S., Vahter M., Krug H., Muhammed M., Scheynius A., Fadeel B. Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011. Vol. 253. P. 81-93.
241. Kuznetsov V.L., Elumeeva K.V., Ishchenko A.V., Beylina N.Y., Stepashkin A.A., Moseenkov S.I., Plyasova L.M., Molina I.Y., Romanenko A.I., Anikeeva O.B., Tkachev E.N. Multiwalled carbon nanotubes with ppm level of impurities // *Physica Status Solidi B*. 2010. Vol. 247. P. 2695–2699.
242. Kuznetsov V.L., Krasnikov D.V., Schmakov A.N., Elumeeva K.V. In situ and ex situ time resolved study of multi-component Fe-Co oxide catalyst activation during MWNT synthesis // *Physica Status Solidi B*. 2012. Vol. 249. P. 2390–2394.
243. Lademann J., Weigmann H.-J., Rickmeyer C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., Sterry W. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice // *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. 1999. Vol. 12 (5). P. 247-256.
244. Lahir Y.K. Impacts of Metal and Metal Oxide Nanoparticle on Embryos // *Austin Endocrinol Diabetes Case Rep*. 2017. Vol. 2(1). P. 1009-1017.
245. Landsiedel R., Kapp M. D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential

- artifacts and limitations - Many questions, some answers. *Mutation Research // Reviews in Mutation Research*. 2009. Vol. 681. P. 241-258.
246. Lai D.Y. Approach to using mechanism-based structure activity relationship (SAR) analysis to assess human health hazard potential of nanomaterials // *Food Chem Toxicol*. 2015. Vol. 85. P. 120-126.
247. Lead J.R., Batley G.E., Alvarez P.J. J., Croteau M.-N., Handy R.D., McLaughlin M.J., Judy J.D., Schirmer K. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects - An updated review // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2018. 37. P. 2029–2063.
248. Lemmermann E. Der grosse Waterneverstorfer Binnensee // *Eine biologische Studie*. 1896. Vol. 6. P. 166–205.
249. Li P., Li Z.-H. Environmental co-exposure to TBT and Cd caused neurotoxicity and thyroid endocrine disruption in zebrafish, a three-generation study in a simulated environment // *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 259. P. 113-118.
250. Li M., Lin D., Zhu L. Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to *Escherichia coli* // *Environmental Pollution*. 2013. 173. P 97-102.
251. Li X., Peng T., Mu L., Hu X. Phytotoxicity induced by engineered nanomaterials as explored by metabolomics: Perspectives and challenges // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Vol. 184. P. 209-216.
252. Li M., Zhu J., Fang H., Wang M., Wang Q., Zhou B. Coexposure to environmental concentrations of cis-bifenthrin and graphene oxide: Adverse effects on the nervous system during metamorphic development of *Xenopus laevis* // *Journal of Hazardous Materials*. 2020. Vol. 381. P. 120-129.
253. Liang B., Lehmann J. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil // *Organic Geochemistry*. 2010. Vol. 41. Issues. 2. P. 396-406.
254. Lin H., Bu Q., Cen X., Zhao Y.L. Current methods and research progress in nanomaterials risk assessment // *Current Drug Metabolism*. 2012. Vol. 13(4). P. 354-63.
255. Litasova E.V., Iljin V.V., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Dumpis M.A., Piotrovskiy L.B. The biodegradation of fullerene C₆₀ by myeloperoxidase // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016. Vol. 471. Issue 1. P. 417-420.

256. Liu X., Hurt R. H., Kane A. B. Biodurability of single-walled carbon nanotubes depends on surface functionalization // *Carbon*. 2010. Vol. 48. P. 1961-1969.
257. Liu X., Zhang Y., Li J. Cognitive Deficits and Decreased Locomotor Activity Induced by Single Walled Carbon Nanotubes and Neuroprotective Effects of Ascorbic Acid // *Intern. J. Nanomed.* 2014. V. 9. P. 823–839.
258. Liu N., Tang M., Ding J. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells // *Chemosphere*. 2020. Vol. 245. P. 320-325.
259. López-Moreno M. L., Cassé C., Correa-Torres S. N. Engineered NanoMaterials interactions with living plants: Benefits, hazards and regulatory policies // *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2018. Vol. 6. P. 36-41.
260. Lu S., Zhang W., Zhang R., Liu P., Wang Q., Shang Y., Wu M., Donaldson K., Wang Q. Comparison of cellular toxicity caused by ambient ultrafine particles and engineered metal oxide nanoparticles // *Particle and Fibre Toxicology*. 2015. Vol. 12. P. 80-86.
261. Lu, T., Qu Q., Lavoie M., Cai Z., Qian H. Insights into the transcriptional responses of a microbial community to silver nanoparticles in a freshwater microcosm // *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 258. P. 113-121.
262. Luo Z., Wang Z., Yan Y., Li J., Yan C., Xing B. Titanium dioxide nanoparticles enhance inorganic arsenic bioavailability and methylation in two freshwater algae species // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 238. P. 631-637.
263. Ma L., Andoh V., Adjei M.O., Liu H., Shen Z., Li L., Song J., Zhao W., Wu G. In vivo toxicity evaluation of boron nitride nanosheets in *Bombyx mori* silkworm model // *Chemosphere*. 2020. Vol. 247. P. 225-229.
264. Maji J., Pandey S., Basu S. Synthesis and evaluation of antibacterial properties of magnesium oxide nanoparticles // *Bulletin of Materials Science*. 2020. Vol. 43(1). P. 25-31.
265. Mansas C., Mendret J., Brosillon S., Ayrat A. Coupling catalytic ozonation and membrane separation: A review // *Separation and Purification Technology*. 2020. Vol. 236. P. 216-221.
266. Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J.W., Celio M., Catsicas S., Schwaller B., Forro L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials // *Nano Letters*. 2006. № 6. P. 1121–1125.

267. Marwood A Christopher, Keith R., Bruce M. Greenberg Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001. Vol. 20(4). P. 890-898.
268. Martín-de-Lucía I., Gonçalves S.F., Leganés F., Fernández-Piñas F., Rosal R., Loureiro S. Combined toxicity of graphite-diamond nanoparticles and thiabendazole to *Daphnia magna* // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 688. P.1145-1154.
269. Matouke M. M., Elewa D. T., Abdullahi K. Binary effect of titanium dioxide nanoparticles (nTio₂) and phosphorus on microalgae (*Chlorella ellipsoides* Gerneck, 1907) // *Aquatic Toxicology* 2018. Vol. 198. P. 40-48.
270. Matthews I. P., Gregory C. J., Aljanyoussi G., Morris C. J., McDonald I., Hoogendoorn B., Gumbleton M. Maximal extent of translocation of single-walled carbon nanotubes from lung airways of the rat // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013. Vol. 35. P. 461-464.
271. Mavon A., Miquel C., Lejeune O., Payre B., Moretto P. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen // *Skin Pharmacol. Physiol*. 2007. Vol. 20(1). P. 10-20.
272. Maynard A.D., Baron P.A., Foley M., Shvedova A.A., Kisin E.R., Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: Aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material // *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*. 2004. Vol. 67. Issue 1. P. 87-107.
273. Mecke A., Uppuluri S., Sassanella T.M., Lee D.K., Ramamoorthy A., Baker J.R., Orr B.G., Banaszak Holl M.M. Direct observation of lipid bilayer disruption by poly(amidoamine) dendrimers // *Chem. Phys. Lipids*. 2004. Vol. 132(1). P. 3-14.
274. Menachem A., Chapman J., Deri Y., Pick C.G., Katzav A. Immunoglobulin-mediated neuro-cognitive impairment: new data and a comprehensive // *Allergy Immunol*. 2013. Vol. 45. P. 248-255.
275. Meng L., Zhang X., Lu Q., Fei Z., Dyson P. J. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: Targeting doxorubicin to tumors // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. P. 1689-1698.

276. Mercer R.R., Hubbs A.F., Scabilloni J.F., Wang L., Battelli L.A., Schwegler-Berry D., Castranova V., Porter D.W. Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes // *Part. Fibre Toxicol.* 2010. Vol. 7. P. 28-37.
277. Merum S., Veluru J. B., Seeram R. Functionalized carbon nanotubes in bio-world: Applications, limitations and future directions // *Materials Science and Engineering B.* 2017. Vol. 223. P. 43-63.
278. Miazek K., Remacle C., Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis // *International Journal of Molecular Sciences.* 2015. Vol. 16(10). P. 23929-23969
279. Miller M., Bankier C., Al-Shaeri M., Hartl M.G. Neutral red cytotoxicity assays for assessing in vivo carbon nanotube ecotoxicity in mussels – Comparing microscope and microplate methods // *Marine Pollution Bulletin.* 2015. Vol. 101. P. 903-907.
280. Miller M.R., Raftis J.B., Langrish J.P., McLean S.G., Samutrtai P., Connell S.P., Wilson S., Vesey A.T., Fokkens P.H.B., Boere A.J.F., Krystek P., Campbell C.J., Hadoke P.W.F., Donaldson K., Cassee F.R., Newby D.E., Duffin R., Mills N.L. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease // *ACS Nano.* 2017. Vol. 11. Issue 5. P. 4542-4552.
281. Mintcheva N., Gicheva G., Panayotova M., Wunderlich W., Kuchmizhak A.A., Kulinich S.A. Preparation and photocatalytic properties of CdS and ZnS nanomaterials derived from metal xanthate // *Materials.* 2019. Vol. 12(20). 33-39.
282. Mortimer M., Kasemets K., Kahru A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* // *Toxicology.* 2010. Vol. P. 269. 182-189.
283. Munk M., Camargo L. S. A., Quintão C. C. R., Silva S. R., Souza E. D., Raposo N. R. B., Marconcini J. M., Jorio A., Ladeira L. O., Brandão H. M. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2016. Vol. 12. P. 1151-1159.
284. Murali M., Suganthi P., Athif P., Sadiq Bukhari A., Syed Mohamed H. E., Basu H., Singhal R. K. Histological alterations in the hepatic tissues of Al₂O₃ nanoparticles exposed freshwater fish *Oreochromis mossambicus* // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2017. Vol. 44. P. 125-131.

285. Mykhailiv O., Zubyk H., Plonska-Brzezinska M. E. Carbon nano-onions: Unique carbon nanostructures with fascinating properties and their potential applications // *Inorganica Chimica Acta*. 2017. Vol. 468. P. 49–66.
286. Nadol J.B., Brzin M., De Lorenzo A.J. Fine structural localization of acetylcholinesterase in sensory and motor neurons of the muscle receptor organ in homarus // *J. Comp. Neurol.* 1970. Vol. 140(4). P. 399-419.
287. Naganuma T., Traversa E. The effect of cerium valence states at cerium oxide nanoparticle surfaces on cell proliferation // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35. P. 4441-4453.
288. Nair R., Varghese S.H., Nair B.G., Maekawa T., Yoshida Y., Kumar D.S. Nanoparticle material delivery to plants // *Plant Science*. 2010. Vol. 179. P. 154-163.
289. Monteiro-Riviere N.A., Lang Tran C. Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects. // Eds.. Informa Healthcare, New York-London. 2007. Vol. 17. P. 434-441.
290. Natasha Shahid M., Farooq A.B.U., Rabbani F., Khalid S., Dumat C. Risk assessment and biophysiochemical responses of spinach to foliar application of lead oxide nanoparticles: A multivariate analysis // *Chemosphere*. 2020. Vol. 245. P. 597-605.
291. Navarro D.A., Kookana R.S., McLaughlin M.J., Kirby J.K. Fate of radiolabeled C60 fullerenes in aged soils // *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 221. P. 293-300.
292. Neermana M.F., Zhang W., Parrish AR., Simanek E.E. In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2004. Vol. 281. Issues 1–2. P. 129-132.
293. Nel A., Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // *Science*. 2006. Vol. 311 (5761). P. 622–627.
294. Newman P., Minett A., Ellis-Behnke R., Zreiqat H. Carbon nanotubes: Their potential and pitfalls for bone tissue regeneration and engineering // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013. Vol. 9. P. 1139-1158.
295. Nigro M., Bernardeschi M., Costagliola D., Della Torre C., Frenzilli G., Guidi P., Lucchesi P., Mottola F., Santonastaso M., Scarcelli V., Monaci F., Corsi I., Stingo V., Rocco L. n-TiO₂ and CdCl₂ co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium: Genomic, DNA and chromosomal damage evaluation in the marine fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) // *Aquatic Toxicology*. 2015. Vol. 168. P. 72-77.

296. Niska K., Zielinska E., Radomski M. W., Inkielewicz-Stepniak I. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells // *Chemico-Biological Interactions*. 2017. Vol. 295. P. 38-51.
297. Nohynek G.J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M.S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety // *Crit. Rev. Toxicol.* 2007. Vol. 37(3). P. 251-277.
298. Nunes S. M., Josende M. E., Ruas C. P., Gelesky M. A., Júnior F. M. R. d. S., Fattorini D., Regoli F., Monserrat J. M., Ventura-Lima J. Biochemical responses induced by co-exposition to arsenic and titanium dioxide nanoparticles in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* // *Toxicology*. 2017. Vol. 376. P. 51-58.
299. Oberdörster G., Ferin J., Lehnert B.E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury // *Environ. Health. Perspect.* 1994. Vol. 102 (Suppl. 5). P. 173–179.
300. Oberdörster G., Finkelstein J.N., Johnston C., Gelein R., Cox C., Baggs R. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice // *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 2000. Vol. 96. P. 65–74.
301. Oleszczuk P., Czech B., Kończak M., Bogusz A., Siatecka A., Godlewska P., Wiesner M. Impact of ZnO and ZnS nanoparticles in sewage sludge-amended soil on bacteria, plant and invertebrates // *Chemosphere*. 2019. Vol. 237. P. 43-59.
302. Oliveira C.R., Garcia T.D., Franco-Belussi L., Salla R.F., Souza B.F.S., de Melo N.F.S., Irazusta S.P., Jones-Costa M., Silva-Zacarin E.C.M., Fraceto L.F. Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: Toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles // *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 253. P. 1009-1020.
303. Pan Y.-T., Yang H. Design of bimetallic catalysts and electrocatalysts through the control of reactive environments // *Nano Today*. 2020. Vol. 23. P. 109-124.
304. Panov V., Minigalieva I., Bushueva T., Fröhlich E., Meindl C., Absenger-Novak M., Shur V., Shishkina E., Gurvich V., Privalova L., Katsnelson B.A. Some Peculiarities in the Dose Dependence of Separate and Combined In Vitro Cardiotoxicity Effects Induced by CdS and PbS Nanoparticles With Special Attention to Hormesis Manifestations // *Dose-Response*. 2020. Vol. 18. Issue 1. P. 246-258.
305. Papageorgiou I., Brown C., Schins R., Singh S., Newson R., Davis S., Fisher J., Ingham

- E., Case C. P. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28. P. 2946-2958.
306. Parisi C., Vigani M., Rodríguez-Cerezo E. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? // *Nano Today*. 2015. Vol. 10. Issue 2. P. 124-127.
307. Park E.-J., Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro // *Toxicology Letters*. 2009. Vol. 184. P. 18-25.
308. Parke M. Studies on marine flagellates // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1949. Vol. 28. P. 255-288.
309. Patiño Y., Díaz E., Ordóñez S., Gallegos-Suarez E., Guerrero-Ruiz A., Rodríguez-Ramos I. Adsorption of emerging pollutants on functionalized multiwall carbon nanotubes // *Chemosphere*. 2015. Vol. 136. P. 174-180.
310. Paunovic J., Vucevic D., Radosavljevic T., Mandić-Rajčević S., Pantic I. Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis // *Chemico-Biological Interactions*. 2020. Vol. 316. P. 26-34.
311. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // *J. Neurosci. Methods*. 1985. Vol. 14, P. 149-167.
312. Pellow S., File S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: A novel test of anxiety in the rat // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986. Vol. 24. P. 525-529.
313. Peng Z., Liu X., Zhang W., Zeng Z., Liu Z., Zhang C., Liu Y., Shao B., Liang Q., Tang W., Yuan X. Advances in the application, toxicity and degradation of carbon nanomaterials in environment: A review // *Environment International*. 2020. Vol. 134. P. 329-334.
314. Pešić M., Podolski-Renić A., Stojković S., Matović B., Zmejkoski D., Kojić V., Bogdanović G., Pavićević A., Mojović M., Savić A., Milenković I., Kalauzi A., Radotić K. Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity // *Chemico-Biological Interactions*. 2015. Vol. 232. P. 85-93.
315. Petersen E.J., Mortimer M., Burgess R.M., Handy R., Hanna S., Ho K.T., Johnson M., Loureiro S., Selck H., Scott-Fordsmand J.J., Spurgeon D., Unrine J., Van Den Brink N.W.,

- Wang Y., White J., Holden P. Strategies for robust and accurate experimental approaches to quantify nanomaterial bioaccumulation across a broad range of organisms // *Environmental Science: Nano*. 2019. Vol. 6. Issue 6. P. 1619-1656.
316. Philbrook N. A., Winn L. M., Afrooz A. R. M. N., Saleh N. B., Walker V. K. The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011. Vol. 257. P. 429-436.
317. Pikula K.S., Zakharenko A.M., Chaika V.V., Vedyagin A.A., Orlova T.Y., Mishakov I.V., Kuznetsov V.L., Park S., Renieri E.A., Kahru A., Tsatsakis A.M., Golokhvast K.S. Effects of carbon and silicon nanotubes and carbon nanofibers on marine microalgae *Heterosigma akashiwo* // *Environmental Research*. 2018. Vol. 166. P. 473-480.
318. Pikula K., Zakharenko A., Chaika V., Kirichenko K., Tsatsakis A.M., Golokhvast K. Risk assessment in nanotoxicology: Bioinformatics and computational approaches // *Current Opinion in Toxicology*. 2020. Vol. 19. P. 1-6.
319. Pikula K., Mintcheva N., Kulinich S.A., Zakharenko A., Markina Z., Chaika V., Orlova T., Mezhev Y., Kokkinakis E., Tsatsakis A., Golokhvast K. Aquatic toxicity and mode of action of CdS and ZnS nanoparticles in four microalgae species // *Environmental Research*. 2020. P. 513-520.
320. Piotrovskiy L.B., Litasova, E.V., Sokolov A.V., Iljin V.V., Utsal V.A., Zhurkovich, I.K. Degradation of fullerene C₆₀ by human myeloperoxidase and some reaction products // *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2020. Vol. 28. Issue 3. P. 196-201.
321. Prakash S., Malhotra M., Shao W., Tomaro-Duchesneau C., Abbasi S. Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. Vol. 63. P. 1340-1351.
322. Pumera M., Iwai H. Multicomponent metallic impurities and their influence upon the electrochemistry of carbon nanotubes // *Journal of Physical Chemistry C*. 2009. Vol. 113. P. 4401-4405.
323. Quignard S., Mosser G., Boissière M., Coradin T. Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. P. 4431-4442.

324. Rabolli V., Thomassen L. C. J., Uwambayinema F., Martens J. A., Lison D. The cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles is mainly influenced by surface area and not by aggregation // *Toxicology Letters*. 2011. Vol. 206. P. 197-203.
325. Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D., Drews M., Morandi M., Malinski T., Radomski M.W. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis // *Br. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 146(6). P. 82-93.
326. Raghunathan V. K., Devey M., Hawkins S., Hails L., Davis S. A., Mann S., Chang I. T., Ingham E., Malhas A., Vaux D. J., Lane J. D., Case C. P. Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34. № 3559-3570.
327. Rahiminezhad Z., Tamaddon A.M., Borandeh S., Abolmaali S.S. Janus nanoparticles: New generation of multifunctional nanocarriers in drug delivery, bioimaging and theranostics // *Applied Materials Today*. 2020. Vol. 18. P.113-118.
328. Reddy A. R. N., Rao M. V., Krishna D. R., Himabindu V., Reddy Y. N. Evaluation of oxidative stress and anti-oxidant status in rat serum following exposure of carbon nanotubes // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2011. Vol. 59. P. 251-257.
329. Reeves J. F., Davies S. J., Dodd N. J. F., Jha A. N. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2008. Vol. 640. P. 113-122.
330. Ren X., Chen C., Nagatsu M., Wang X. Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: / *Chemical Engineering Journal*. 2011. Vol. 170. P. 395-410.
331. Rocco L., Santonastaso M., Mottola F., Costagliola D., Suero T., Pacifico S., Stingo V. Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost *Danio rerio* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015. Vol. 113. P. 223-230.
332. Rodríguez-González V., Terashima C., Fujishima A. Applications of photocatalytic titanium dioxide-based nanomaterials in sustainable agriculture // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2019. Vol. 40. P. 49-67.
333. Rocher B., Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne

- contaminants from the Seine River // *Aquatic Toxicology*. 2006. Vol. 79. P. 65-77.
334. Rotini A., Gallo A., Parlapiano I., Berducci M. T., Boni R., Tosti E., Prato E., Maggi C., Cicero A. M., Migliore L., Manfra L. Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018. Vol. 147. P. 852-860.
335. Rotomskis R., Jurgelėnė Ž., Stankevičius M., Stankevičiūtė M., Kazlauskienė N., Jokšas K., Montvydienė D., Kulvietis V., Karabanovas V. Interaction of carboxylated CdSe/ZnS quantum dots with fish embryos: Towards understanding of nanoparticles toxicity // *Science of The Total Environment*. 2018. Vol. 635. P. 1280-1291.
336. Rydman M., Ilves M. Inhalation of rod-like carbon nanotubes causes unconventional allergic airway inflammation // *Part Fibre Toxicol*. 2014. Vol. 11. P. 48-56.
337. Ruiz P., Katsumiti A., Nieto J. A., Bori J., Jimeno-Romero A., Reip P., Arostegui I., Orbea A., Cajaraville M. P. Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis* // *Marine Environmental Research*. 2015. Vol. 111. P. 107-120.
338. Ryman-Rasmussen J.P., Riviere A.J.E., Monteiro-Riviere N.A. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes // *Journal of Investigative Dermatology*. 2007. Vol. 127. Issue 1. P. 143-153.
339. Sadiq I. M., Chowdhury B., Chandrasekaran N., Mukherjee A. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2009. Vol. 5. P. 282-286.
340. Samad K A, Moore A., Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity // *Nature*. 2001. Vol. 410(6827). P. 471-478.
341. Sandini T.M., Udo M.S.B., Reis-Silva T.M., Sanches D., Bernardi M.M., Flório J.C., Spinosa H. Prenatal exposure to integer rimine N-oxide enriched butanolic residue from *Senecio brasiliensis* affects behavior and striatal neurotransmitter levels of rats in adulthood // *Int. J. Dev. Neurosci*. 2015. Vol. 47. P. 157–164.
342. Saquib Q., Al-Khedhairy A. A., Ahmad J., Siddiqui M. A., Dwivedi S., Khan S. T.,

- Musarrat J. Zinc ferrite nanoparticles activate IL-1b, NFKB1, CCL21 and NOS2 signaling to induce mitochondrial dependent intrinsic apoptotic pathway in WISH cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013. Vol. 273. P. 289-297.
343. Sarigiannis D., Gotti A., Cimino Reale G., Marafante, E. Reflections on new directions for risk assessment of environmental chemical mixtures // *International Journal of Risk Assessment and Management*. 2009. Vol. 13(3/4). P. 216–241.
344. Sato Y., Yokoyama A., Shibata K., Akimoto Y., Ogino S., Nodasaka Y., Kohgo T., Tamura K., Akasaka T., Uo M., Motomiya K., Jeyadevan B., Ishiguro M., Hatakeyama R., Watari F., Tohji K. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo // *Mol. Biosyst.* 2005. Vol. 1(2). P. 176-82.
345. Sayapina N.V., Sergievich, A.A., Kuznetsov V.L., Chaika V.V., Lisitskaya I.G., Khoroshikh P.P., Batalova T.A., Tsarouhas K., Spandidos D., Tsatsakis A.M., Fenga C., Golokhvast K.S. Influence of multi-walled carbon nanotubes on the cognitive abilities of Wistar rats // *Exp. Ther. Med.* 2016. Vol. 12. P. 1311–1318.
346. Sayes C.M., Liang F., Hudson J.L., Mendez J., Guo W., Beach J.M., Moore V.C., Doyle C.D., West J.L., Billups W.E., Ausman K.D., Colvin V.L. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro // *Toxicol Lett.* 2006. Vol. 161(2). P. 135-142.
347. Schimke M. M., Stigler R., Wu X., Waag T., Buschmann P., Kern J., Untergasser G., Rasse M., Steinmüller-Nethl D., Krueger A., Lepperdinger G. Biofunctionalization of scaffold material with nano-scaled diamond particles physisorbed with angiogenic factors enhances vessel growth after implantation // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016. Vol. 12. P. 823-833.
348. Sellami B., Mezni A., Khazri A., Bouzidi I., Saidani W., Sheehan D., Beyrem H. Toxicity assessment of ZnO-decorated Au nanoparticles in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* // *Aquatic Toxicology*. 2017. Vol. 188. P. 10-19.
349. Semenov K.N., Andrusenko E.V., Charykov N.A., Litasova E.V., Panova G.G., Penkova A.V., Murin I.V., Piotrovskiy L.B. Carboxylated fullerenes: Physico-chemical properties and potential applications // *Progress in Solid State Chemistry*. 2017. Vol. 47-48. P.

- 19-36.
350. Sandhu K. Feeding the microbiota-gut-brain axis: Diet, microbiome and neuropsychiatry // *Transl. Res.* 2016. Vol. 4. P. 223-244
351. Sendra M., Yeste M. P., Gatica J. M., Moreno-Garrido I., Blasco J. Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*) // *Chemosphere.* 2017. Vol. 179. P. 279-289.
352. Sergievich A., Chaika V., Batalova T., Khoroshikh P., Panichev A., Seryodkin I., Cheremkin M., Kirichenko K., Kodintsev V., Gafurov U., Salanin D., Artemenko A., Golokhvast K. Toxic effects of different-sized zeolite-containing minerals from Kholinsky and Vanginsky deposits (Russia) // *Der. Pharma Chemica.* 2016. Vol. 8. P. 87–97.
353. Sharma S.K., Shrivastava N., Rossi F., Tung L.D., Thanh N.T.K. Nanoparticles-based magnetic and photo induced hyperthermia for cancer treatment // *Nano Today.* 2019. Vol. 29. P. 294-298.
354. Sharma S., Kumar K., Thakur N., Chauhan S., Chauhan M.S. The effect of shape and size of ZnO nanoparticles on their antimicrobial and photocatalytic activities: a green approach // *Bulletin of Materials Science.* 2020. Vol 43(1). P. 446-253.
355. Sheikhpour M., Golbabaie A., Kasaeian A. Carbon nanotubes: A review of novel strategies for cancer diagnosis and treatment // *Materials Science and Engineering C.* 2017. Vol. 76. P. 1289-1304.
356. Shvedova A., Castranova V., Kisin E., Schwegler-Berry D., Murray A., Gandelsman V., Baron P. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells // *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A.* 2003. Vol. 66. Issue 20. P. 1909-1926.
357. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R., Murray A.R., Johnson V.J., Potapovich A.I., Tyurina Y.Y., Gorelik O., Arepalli S., Schwegler-Berry D., Hubbs A.F., Antonini J., Evans D.E., Ku B.-K., Ramsey D., Maynard A., Kagan V.E., Castranova V., Baron P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2005. Vol. 289. Issue 5 33-5. P. 698-708.
358. Shvedova A. A., Pietroiusti A., Fadeel B., Kagan V.E. Mechanisms of carbon nanotube-

- induced toxicity: Focus on oxidative stress // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012. Vol. 261. P. 121-133.
359. Sielicki K., Aleksandrak M., Mijowska E. Oxidized SWCNT and MWCNT as co-catalysts of polymeric carbon nitride for photocatalytic hydrogen evolution // *Applied Surface Science*. 2020. Vol. 508. P. 145-153.
360. Silva P. M. Da., Hégaret H., Lambert C. Immunological responses of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions // *Toxicon*. 2008. Vol. 51. P. 563–573.
361. Singh A., Singh N. B., Hussain I., Singh H. Effect of biologically synthesized copper oxide nanoparticles on metabolism and antioxidant activity to the crop plants *Solanum lycopersicum* and *Brassica oleracea* var. botrytis // *Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 262. P. 11-27.
362. Slowing I. I., Vivero-Escoto J. L., Wu C.-W., Lin V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. Vol. 60. P. 1278-1288.
363. Snyder-Talkington B., Dong C. Multi-walled carbon nanotube-induced gene expression in vitro: Concordance with *in vivo* studies // *Toxicology*. 2015. Vol. 328. P. 66-74.
364. Soh J.H., Chan H.-M., Ying J.Y. Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device // *Nano Today*. 2020. Vol. 36. P. 178-184.
365. Sousa V.S., Ribau Teixeira M. Metal-based engineered nanoparticles in the drinking water treatment systems: A critical review // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 707. P. 916-920.
366. Souza I. C., Mendes V. A. S., Duarte I. D., Rocha L. D., Azevedo V. C., Matsumoto S. T., Elliott M., Wunderlin D. A., Monferrán M. V., Fernandes M. N. Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 658. P. 798-808.
367. Stern S.T., McNeil S.E. Nanotechnology safety concerns revisited // *Toxicol Sci*. 2008. Vol. 101(1). P. 4-21.

368. Stonik I. V., Orlova T.Yu., Crawford R.M. *Attheya ussurensis* sp nov (Bacillariophyta) - a new marine diatom from the coastal waters of the Sea of Japan and a reappraisal of the genus // *Phycologia*. 2006. Vol. 45. P. 141-147.
369. Strigul N., Vaccari L., Galdun C., Wazne M., Liu X., Christodoulatos C., Jasinkiewicz K. Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* // *Desalination*. 2009. Vol. 248. P. 771-782.
370. Sverko V., Sobočanec S., Balog T., Colić M., Marotti T. Natural micronized and clinoptilolite mixed with extract *Urtica dioica* L. as possible antioxidant // *Food Technol. Biotechnol.* 2004. Vol. 42. P. 189-192.
371. Suman T.Y., Radhika Rajasree S.R., Kirubakaran R., Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015. Vol. 113. P. 23–30.
372. Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy // *J. Histochem. Cytochem.* 1997. Vol. 45 (1). P. 49–53.
373. Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K. S. N., Sahul A. S. Hameed In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of *Catla catla* and gill cell line of *Labeo rohita* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2014. Vol. 161. P. 41-52.
374. Talodthaisong C., Boonta W., Thammawithan S., Hutchison J.A., Kulchat S. Composite guar gum-silver nanoparticle hydrogels as self-healing, injectable, and antibacterial biomaterials // *Materials Today Communications*. 2020. Vol 24. P. 196-201.
375. Thomas J.A. , Ballantyne B. Toxicological assessment of zeolites // *Journal of the American College of Toxicology*. 1992. Vol. 11. №3. P. 259–273.
376. Tavangarian F., Li Y. Carbon nanostructures as nerve scaffolds for repairing large gaps in severed nerves // *Ceramics International*. 2012. Vol. 38. P. 6075-6090.
377. Tatur S., Maccarini M., Barker R., Nelson A., Fragneto G. Effect of functionalized Gold nanoparticles on floating lipid bilayers // *Langmuir*. 2013. Vol. 29(22). P. 6606–6614.
378. Tedesco S., Doyle H., Blasco J., Redmond G., Sheehan D. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis* // *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 100. P. 178-186.
379. Tedesco S, Doyle H, Redmond G, Sheehan D. Gold nanoparticles and oxidative stress

- in *Mytilus edulis* // *Marine Environmental Research*. 2008. Vol. 66. № 131-138.
380. Thibodeau M.S., Charles G., Knecht D.A., Helble J., Hubbard A.K. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity // *Toxicological Sciences*. 2004. Vol. 80. Issue 1. P. 34–48.
381. Tian M., Chang X., Zhang Q., Li C., Li S., Sun Y. TGF- β 1 mediated MAPK signaling pathway promotes collagen formation induced by Nano NiO in A549 cells // *Environmental Toxicology*. 2019. Vol. 34. Issue 6. P. 719-727.
382. Tokareva I.V., Mishakov I.V., Korneev D.V., Vedyagin A.A., Golokhvast K.S. Nanostructuring of the carbon macrofiber surface // *Nanotechnol. Russ.* 2015. Vol. 10. P. 158–164.
383. Tortella G.R., Rubilar O., Durán N., Diez M.C., Martínez M., Parada J., Seabra A.B. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment // *Journal of Hazardous Materials*. 2020. Vol. 390. P. 46-55.
384. Trevisan R., Delapiedra G., Mello D. F., Arl M., Schmidt É. C., Meder F., Monopoli M., Cargnin-Ferreira E., Bouzon Z. L., Fisher A. S., Sheehan D., Dafre A. L. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress // *Aquatic Toxicology*. 2014. Vol. 153. P. 27-38.
385. Turkevich J., Stevenson P.S., Hiller J. // *Discuss. Faraday Soc.* -1955.- № 11. -P. 55-75.
386. Twiner M. J., Dixon S. J. and Trick C. G. Toxic effects of *Heterosigma akashiwo* do not appear to be mediated by hydrogen peroxide // *Limnol. Oceanogr* 2001. Vol. 46. P. 1400–1405.
387. Vaijayanthimala V., Cheng P.-Y., Yeh S.-H., Liu K.-K., Hsiao C.-H., Chao J.-I., Chang H.-C. The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an in vivo contrast agent // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33. P. 7794-7802.
388. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress // *Current Medicinal Chemistry*. 2005. Vol. 12(10). P. 161-168.
389. Verma S. K., Das A. K., Gantait S., Kumar V., Gurel E. Applications of carbon nano-materials in the plant system: A perspective view on the pros and cons // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 667. P. 485-499.
390. Vicari T., Dagostim A. C., Klingelfus T., Galvan G. L., Monteiro P. S., da Silva Pereira

- L., Silva de Assis H. C., Cestari M. M. Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and lead at environmentally relevant concentrations in the neotropical fish species *Hoplias intermedius* // *Toxicology Reports*. 2018. Vol. 5. P. 1032-1043.
391. Vignardi C. P., Hasue F.M., Sartório P.V., Cardoso C.M., Machado A.S.D., Passos M. J.A.C.R., Santos T.C.A., Nucci J.M., Hewer T.L.R., Watanabe I.-S., Gomes V., Phan N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) // *Aquatic Toxicology*. 2015. Vol. 158. P. 218-229.
392. Vishwakarma K., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Tripathi D.K., Sharma S. Silicon and plant growth promoting rhizobacteria differentially regulate AgNP-induced toxicity in *Brassica juncea*: Implication of nitric oxide // *Journal of Hazardous Materials*. 2020. Vol. 390. P. 218-226.
393. Vitkina T.I., Yankova V.I., Gvozdenko T.A., Kuznetsov V.L., Krasnikov D.V., Nazarenko A.V., Chaika V.V., Smagin S.V., Tsatsakis A., Engin A.B., Karakitsios S.P., Sarigiannis D.A., Golokhvast K.S. The impact of multi-walled carbon nanotubes with different amount of metallic impurities on immunometabolic parameters in healthy volunteers // *Food and Chemical Toxicology*. 2016. Vol. 87. P. 138–147.
394. Vogelzangs N., de Jonge P., Smit J H. Cytokine production capacity in depression and anxiety // *Transl. Psychiatry*. 2016 Vol. 31.6(5). P. 825-832.
395. Volland M., Hampel M., Martos-Sitcha J.A., Trombini C., Martínez-Rodríguez G., Blasco J. Citrate gold nanoparticle exposure in the marine bivalve *Ruditapes philippinarum*: uptake, elimination and oxidative stress response // *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. Vol. 22. P. 414-420.
396. Waghmode M.S., Gunjal A.B., Mulla J.A., Patil N.N., Nawani N.N. Studies on the titanium dioxide nanoparticles: biosynthesis, applications and remediation // *Sn Applied Sciences*. 2019. Vol. 1. P. 384-390.
397. Wang D., Hu J., Forthaus B.E., Wang J. Synergistic toxic effect of nano-Al₂O₃ and As(V) on *Ceriodaphnia dubia* // *Environmental Pollution*. 2011. Vol. 159. P. 3003-3008.
398. Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells // *Toxicology in*

- Vitro*. 2009a. Vol. 23. P. 808-815.
399. Wang H., Wick R. L., Xing B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Environmental Pollution*. 2009. Vol 157. P. 1171-1177.
400. Wang H., Ding J., Ding S., Chang Y. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses identify critical genes in eicosapentaenoic acid biosynthesis and metabolism in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. Issue 1. P. 44-49.
401. Wang X., Qu R., Liu J., Wei Z., Wang L., Yang S., Huang Q., Wang Z. Effect of different carbon nanotubes on cadmium toxicity to *Daphnia magna*: The role of catalyst impurities and adsorption capacity // *Environmental Pollution*. 2016. Vol. 208. P. 732-738.
402. Wang Z, Zhang T, Huang F, Wang Z. The reproductive and developmental toxicity of nanoparticles: A bibliometric analysis // *Toxicol Ind Health*. 2018. Vol. 34(3). P, 169-177.
403. Warheit D.B., What is currently known about the health risks related to carbon nanotube exposures? // *Carbon*. 2006. Vol. 44. Issue 6. P. 1064-1069.
404. Papageorgiou Warheit D.B., Webb T.R., Colvin V.L., Reed K.L., Sayes C.M. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics // *Toxicol. Sci*. 2007. Vol. 95(1). P. 270-280.
405. Wimmer A., Markus A.A., Schuster M. Silver nanoparticle levels in river water: Real environmental measurements and modeling approaches - A comparative study // *Environmental Science and Technology Letters*. 2019. Vol. 6. Issue 6. P. 353-358.
406. Wimmer A., Urstoeger A., Funck N.C., Adler F.P., Lenz L., Doeblinger M., Schuster M. What happens to silver-based nanoparticles if they meet seawater? // *Water Research*. 2020. Vol. 171. P. 177-183.
407. Wise J. P., Goodale B. C., Wise S. S., Craig G. A., Pongan A. F., Walter R. B., Thompson W. D., Ng A.-K., Aboueissa A.-M., Mitani H., Spalding M. J., Mason M. D. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells // *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 97. P. 34-41.
408. Wu B., Wu J., Liu S., Shen Z., Chen L., Zhang X.-X., Ren H.-Q. Combined effects of

- graphene oxide and zinc oxide nanoparticle on human A549 cells: bioavailability, toxicity and mechanisms // *Environmental Science: Nano*. 2019. Vol. 6. Issue 2. P.635-645.
409. Wu D., Yang S., Du W., Yin Y., Zhang J., Guo H. Effects of titanium dioxide nanoparticles on *Microcystis aeruginosa* and microcystins production and release // *Journal of Hazardous Materials*. 2019. Vol. 377. P. 1-7.
410. Wu T., Tang M. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs // *Journal of Applied Toxicology*. 2017. Vol. 38(1). P. 25–40.
411. Xi G., Robinson E., Mania-Farnell B., Vanin E. F., Shim K.-W., Takao T., Allender E. V., Mayanil C. S., Soares M. B., Ho D., Tomita T. Convection-enhanced delivery of nanodiamond drug delivery platforms for intracranial tumor treatment // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014. Vol. 10. P. 381-391.
412. Xia T., Kovochich M., Brant J. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm // *Nano Lett*. 2006. № 6. P. 1794–807.
413. Xing W.L., Lalwani G., Rusakova I., Sitharaman B. Degradation of graphene by hydrogen peroxide // *Particle and Particle Systems Characterization*. 2014. Vol. 31 (7). P. 745-750
414. Yamamoto M., Yamazaki S., Uematsu S., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Kuwata H., Takeuchi O., Takeshige K., Saitoh T., Yamaoka S., Yamamoto N., Yamamoto S., Muta T., Takeda K., Akira S. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta // *Nature*. 2004. Vol. 430(6996). P. 218-22.
415. Yamawaki H., Iwai N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 2006. Vol. 290(6). P. C1495-502.
416. Yan K., Liu Y., Yang Q., Liu W., Guo R., Sui J., Yan Z., Chen J. Evaluation of the novel nanoparticle material – CdSe quantum dots on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*: Concentration-time-dependent responses // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Vol. 171. P. 728-736.
417. Yang F., Jin C., Yang D., Jiang Y., Li J., Di Y., Hu J., Wang C., Ni Q., Fu D. Magnetic

- functionalised carbon nanotubes as drug vehicles for cancer lymph node metastasis treatment // *European Journal of Cancer*. 2011. Vol. 47. P. 1873-1882.
418. Yasur J., Pathipati U.R. Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology // *Chemosphere*. 2015. 124. P. 92-102.
419. Yokel R.A., Hancock M.L., Cherian B., Brooks A.J., Ensor M.L., Vekaria H.J., Sullivan P.G., Grulke E.A. Simulated biological fluid exposure changes nanoceria's surface properties but not its biological response // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019. Vol. 144. P. 252-265
420. Zeumer R., Hermsen L., Kaegi R., Knopf, B., Schlechtriem, C. Bioavailability of silver from wastewater and planktonic food borne silver nanoparticles in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 706. P. 76-82.
421. Zhang L., Webster T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration // *Nano Today*. 2009. Vol. 4. P. 66-80.
422. Zhao L., Xu Y.-H., Akasaka T., Abe S., Komatsu N., Watari F., Chen X. Polyglycerol-coated nanodiamond as a macrophage-evading platform for selective drug delivery in cancer cells // *Biomaterials*. 2014. Vol 35. P. 5393-5406.
423. Zhao S., Su X., Wang Y., Yang X., Bi M., He Q., Chen Y. Copper oxide nanoparticles inhibited denitrifying enzymes and electron transport system activities to influence soil denitrification and N₂O emission // *Chemosphere*. 2020. Vol. 245. P. 393-400.
424. Zheng S., Zhou Q., Chen C., Yang F., Cai Z., Li D., Geng Q., Feng Y., Wang H. Role of extracellular polymeric substances on the behavior and toxicity of silver nanoparticles and ions to green algae *Chlorella vulgaris* // *Science of The Total Environment*. 2019. Vol. 660. P. 1182-1190.
425. Zhou H., Ge J., Miao Q., Zhu R., Wen L., Zeng J., Gao M. Biodegradable inorganic nanoparticles for cancer theranostics: Insights into the degradation behavior // *Bioconjugate Chemistry*. 2020. Vol. 31. Issue 2. P. 315-331.
426. Zhu X., Wang J., Zhang X., Chang Y., Chen Y. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain // *Chemosphere*. 2010. Vol.

79. P. 928-933.
427. Zhu Y., Xu F., Liu Q., Chen M., Liu X., Wang Y., Sun Y., Zhang L. Nanomaterials and plants: Positive effects, toxicity and the remediation of metal and metalloid pollution in soil // *Science of the Total Environment*. 2019. Vol. 662. P. 414-421.
428. Zhu Y., Wu J., Chen M., Liu X., Xiong Y., Wang Y., Feng T., Kang S., Wang X. Recent advances in the biotoxicity of metal oxide nanoparticles: Impacts on plants, animals and microorganisms // *Chemosphere*. 2019. Vol. 237. № P. 186-193
429. Ziglari T., Anderson D.S., Holian A. Determination of the relative contribution of the non-dissolved fraction of ZnO NP on membrane permeability and cytotoxicity // *Inhalation Toxicology*. 2020. Vol. 32. Issue 2. P. 86-95
430. Zou X.-Y., Xu B., Yu C.-P., Zhang H.-W. Combined toxicity of ferroferric oxide nanoparticles and arsenic to the ciliated protozoa *Tetrahymena pyriformis* // *Aquatic Toxicology*. 2013. Vol. 134. P. 66-73.