

На правах рукописи



**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)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Петропавловск-Камчатский – 2021

Работа выполнена в научно-образовательном Центре нанотехнологии Политехнического института ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» Министерства науки и образования Российской Федерации

**Научный консультант:** **Голохваст Кирилл Сергеевич,**  
доктор биологических наук,  
член-корр. РАО, профессор РАН

**Официальные оппоненты:** **Гмошинский Иван Всеволодович,**  
доктор биологических наук,  
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,  
лаборатория пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий,  
ведущий научный сотрудник

**Чурилов Геннадий Иванович,**  
доктор биологических наук, доцент,  
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»,  
кафедра общей химии,  
профессор

**Сутункова Марина Петровна,**  
доктор медицинских наук,  
ФГБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ), г. Москва

Защита состоится «10» марта 2022 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета 37.2.005.01 при ФГБОУ ВО «Камчатский государственный технический университет», по адресу: 683003, г. Петропавловск-Камчатский ул. Ключевская, 35.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 683003, г. Петропавловск-Камчатский, ул. Ключевская, д. 35 (КамчатГТУ). Диссертационный совет 37.2.005.01.

Тел.: (4152)300-877; факс: (4152)42-05-01; e-mail: oni@kamchatgtu.ru.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «КамчатГТУ» (<https://www.kamchatgtu.ru>).

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Климова Анна Валерьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** 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 (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 (Mansas et al., 2020; Rahiminezhad et al., 2020; Sielicki et al., 2020).

Использование нанотехнологий и наноматериалов бесспорно является одним из самых перспективных направлений науки и техники в XXI в. – веке нанотехнологий (Hajiabadi 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).

Сегодня согласно разным классификациям, выделяют несколько десятков видов наноматериалов (НМ). Безусловно, 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 (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 нанокompозит, 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.

В настоящее время в мире проведено много оригинальных, но разрозненных работ о влиянии НМ на разные группы растений (Fincheira et al., 2020; Vishwakarma et al., 2020), на бактерии (Sharma et al., 2020; Talodthaisong et al., 2020) и отдельные таксоны животных: беспозвоночные (Cimen et al., 2020; Ma et al., 2020; Wang et al., 2020), рыбы (Bao et al., 2020; 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 никакой информации о влиянии наноматериалов на птиц и пресмыкающихся и 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.

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 исследования.** Впервые с использованием единой приборно-аналитической базы, едиными методами исследования изучены ответные реакции 16-ти далеких по таксономическому положению видов на воздействие загрязнения окружающей среды наночастицами. 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 вне зависимости от уровня организации организмов и строения их клеток из изученных загрязнителей наиболее токсичными являются частицы на основе металлов CdS, ZnS. 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 двусторчатых 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-химическим свойствам НМ, процессам их генезиса и переноса (Lademann et al., 1999; Brown et al., 2001; Borm, 2002; Shvedova et al., 2003, 2005; Maunard et al., 2004; Остроумов и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Гусев и др., 2010; 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 точках. 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. 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 (Санкт-Петербург, 2012); III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (2012, Казань, 2012); Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов», посвященной памяти член-корр. АМН СССР профессора Ф.М. Лазаренко (Оренбург, 2013); XVIII International Congress on Rehabilitation in Medicine and Immunorehabilitation and the VI World Asthma; Allergy & COPD Forum (London, UK, 2013); Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013); VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2013); International Conference on Agricultural and Biosystem Engineering (Beijing, China, 2014); International Conference on Photonics of Nano- and Micro-Structures (Tomsk, 2015); 52<sup>nd</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) (Seville, Spain, 2016); международной научно-практической конференции «Эколого-биологическое благополучие растительного и животного мира» (Благовещенск, 2017); молодежной секции 12-й Российско-Германской сырьевой конференции (Санкт-Петербург, 2019).

**Публикации.** По материалам диссертации получено 2 патента РФ, опубликовано 41 научная работа, включая 2 коллективные монографии, 19 статей 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 страницах, 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. Пиккуле, 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В **Главе 1** «Обзор литературы» выражено актуальное состояние знаний о характеристиках и классификации новых типов техногенных загрязняющих веществ (наночастиц), перспективных объемах производства данных загрязнителей и возможных путях их поступления в окружающую среду. Среди таких загрязнителей рассматриваются наночастицы различных типов: природные и синтетические (углеродные, металлические, минеральные). Рассмотрены существующие способы оценки экологической опасности и методы определения уровня воздействия наночастиц на живые различные живые организмы и окружающую среду, приведены основные принципы биоиспытаний.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В **Главе 2** представлены: (1) подробное описание исследуемых образцов наночастиц; (2) методы, с помощью которых были определены свойства и характеристики данных образцов; (3) описание живых организмов, используемых в качестве тест-объектов биоиспытаний; (4) модели биоиспытаний.

**Природные минеральные наночастицы.** В эксперимент были взяты цеолиты Люльинского, Вангинского, Куликовского, Холинского и Шивертуйского месторождений.

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).

**Многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ).** Многослойные углеродные нанотрубки были получены в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (г. Новосибирск) (Kuznetsov et al., 2010, 2012). Характеристики МУНТ приведены в табл. 1.

**Углеродные нановолокна (УНВ).** Характеристики УНВ приведены в табл. 2. УНВ были синтезированы в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (Новосибирск) (Golokhvast et al., 2015).

**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)  $395 \text{ м}^2/\text{г}$ ,  $d \geq 40\text{--}45 \text{ нм}$ .

**Наночастицы металлов.** Золотые наночастицы диаметром 60-80 нм получены методом Туркевича (Turkevich et al., 1955). Наночастицы  $\text{TiO}_2$  произведены компанией Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher GmbH, Kandel, Germany, CAS number 1317-70-0, product number 39953).

Частицы диоксида титана имеют средний размер 32 нм и имеют фазовую структуру анатаза. 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).

Средний размер наночастиц составил 6,3 нм (5–9 нм) и 3,9 (2,6–5,6 нм) нм соответственно для CdS и ZnS.

Таблица 1 – Многослойные нанотрубки

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

Таблица 2 – Углеродные нановолокна

| Тип   | Марка  | Физ.-хим. характеристика |
|-------|--|--------------------------|
| УНВ-1 | <b>УНВ-1.1</b> Температура синтеза 600 °С, примеси: Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 0,4 %, Ni – след<br><b>УНВ-1.2</b> Температура синтеза 800 °С, примеси: Ni – 3,6 %, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 0,4 %<br><b>УНВ-1.3</b> Температура синтеза 500 °С, C3-C4 площадь удельный поверхность 103 м <sup>2</sup> /г | Необработанные           |
| УНВ-2 | <b>УНВ-2.1</b> Обработаны HNO <sub>3</sub> , площадь удельный поверхность 125 м <sup>2</sup> /г<br><b>УНВ-2.2</b> Обработаны HNO <sub>3</sub> , площадь удельный поверхность 103 м <sup>2</sup> /г   | Обработанные             |

**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. Кинетические исследования методом спектрофотометрии проводились с использованием двухканального спектрометра UV 2550 (Shimadzu, Tokio, Japan).

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).

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

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.

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. Показатели, оцениваемые в процессе биоиспытаний, и условия их регистрации показаны в табл. 3.

Таблица 3 – 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, <b>PI</b>                                  | 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, <b>FDA</b>                           | FITC (зеленый), 525                       |
| Мембранный потенциал                            | 6 ч, 24 ч         | 3,3-дигексилосакарбонцианин иодид, <b>DIOS<sub>6</sub></b> | FITC (зеленый), 525                       |

### **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. Яйцеклетки получали и подготавливали к эксперименту по стандартной методике (Бузников, Подмарев, 1975).

Для приготовления тестируемых растворов использовали препараты МУНТ с размером частиц 8–10 нм (МУНТ-1.1) и 18–20 нм (МУНТ-2.1). 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. В хроническом эксперименте выдерживали по 10 половозрелых особей в растворах тестируемых веществ в течение 5 сут, ежедневно меняя воду. 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).

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; TiO; Au; CdS; ZnS. Взрослые особи морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1864) были собраны в бухте Новый Джигит зал. Петра Великого Японского моря. 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.

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) класса ракообразных 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 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.

Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и готовили из тканей насекомых. 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; TiO<sub>2</sub>; 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. 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.

Гистопатологические изменения в органах были зафиксированы визуально. Степень вакуолизации клеток в эпителии выражали в виде процента вакуолизованных эпителиоцитов в клеточной популяции. Морфометрический анализ включал измерение длины, ширины и площади клеток и их ядер.

**Исследование популяции гемолимфы с помощью проточной цитометрии.** Для анализа методом проточной цитометрии образцы гемолимфы отбирали из заднего аддуктора 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). 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.

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).

Для биохимического анализа образцы пищеварительной железы и гемолимфы были взяты через 48 ч, немедленно заморожены в жидком азоте и выдерживались при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  перед анализом. Деятельность глутатион-S-трансферазы и каталазы, концентрация восстановленного глутатиона и степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) были проанализированы как молекулярные биомаркеры окислительного стресса. Супернатанты использовали для измерения концентрации белка по методу Гринберга. Концентрацию восстановленного глутатиона измеряли с использованием реагента Элмана, интенсивность ЛПП 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).

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 аэрированные 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;  $\text{TiO}_2$ ; Au; CdS; ZnS. Все наноматериалы были взяты в концентрациях 1; 10; 100; 250 мг/мл; 500 и 1000 мг/мл.

**Млекопитающие. Мыши линии СВА.** Все опыты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества

(86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. В эксперименте использовали мышей самцов линии СВА массой 25–30 г, полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Животные были разделены на 17 экспериментальных групп по 8 шт. в каждой, в том числе: "Контроль" – животные, которые не получали цеолит;

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.

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 OsO<sub>4</sub> 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.

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.

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).

Биопсийные образцы желудка были взяты из кардиального, фундального и антрального отделов в соответствии с золотым стандартом ВОЗ. Полутонкие срезы были окрашены гематоксилином и эозином.

Исследование по парентеральному введению наночастиц золота было проведено на 35 самцах мышей СВА. 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).

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.

**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). 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 осуществляли после наркотизации крысы внутримышечным введением 0,5 мл 5 %-ного раствора кетамина. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы, окрашивали гематоксилин-эозином, изучали под световым микроскопом.

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. 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.

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.

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. 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 возвышенный лабиринт и универсального теста для решения проблем. Эксперименты по дрессировке и тестированию животных проводились в дневное время.

При пероральном введении УНВ на этой экспериментальной установке использовали тридцать самцов крыс линии Вистар в возрасте 3 мес., массой 150–200 г, которые содержались в стандартных условиях вивария

Каждое животное в группе кормили 500 мг/кг массы тела, содержащей углеродные нановолокна (УНВ), в течение 14 дней. 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 врож-

денного 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.

*Измерения интерлейкина.* Использовали метод забора крови из хвостовой вены. Мы использовали наборы (диагностикумы) ОАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) для каждого типа интерлейкинов. 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.

*Микрофотографии* были получены с помощью конфокальной микроскопии LSM 800 (Carl Zeiss, Германия), Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия), Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), для фотосъемки использовали Axio Cam 3 (Zeiss, Германия) и программу компьютерной морфометрии Axio Vision 4.2, «Leica DM», фотографировали с помощью компьютерной программы «Avigion» и микроскопом Olympus Vx51 с цифровой камерой CD 25.

*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.

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 ( $P < 0,05$ ).

### **ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ**

В **Главе 3** описаны физико-химические свойства металлических, углеродных и минеральных 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 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, флоатирует он на поверхности воды или сразу тонет; сорбирует ли материал из среды тяжелые металлы, катионы/анионы, биомолекулы или остается инертным.

**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).

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;
- концентрация кислотных центров (центров Льюиса и Бренстеда) у металлических наночастиц и композитов;
- поверхностный потенциал (дзета-потенциал).

#### **ГЛАВА 4. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

В **Главе 4** описаны ответные реакции микроорганизмов, беспозвоночных и млекопитающих, вовлеченных в исследование, на углеродные наночастицы (многослойные углеродные нанотрубки и углеродные нановолокна).

Мы исследовали влияние углеродных НЧ на организмы из группы продуцентов: типичные представители фитопланктона Японского моря (*Attheya ussuriensis*, *Heterosigma akashiwo*, *Chaetoceros muelleri*, *Porphyridium purpureum*, *Pseudo-nitzschia pungens*, *Isochrysis galbana*).

Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC<sub>6</sub> снижается на 50 % (EC<sub>50</sub>) в сравнении с контролем. Величины EC<sub>50</sub>, полученные на основе данных проточной цитометрии и рассчитанные в программном пакете GraphPad Prism 7.04, представлены в (табл. 7–10).

Таблица 4 – Результаты биоиспытаний углеродных наночастиц на микроводорослях *A. ussuriensis*

| Твердые частицы | Выживаемость, EC <sub>50</sub> * (мг/л) |        |                        | Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                        | Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC <sub>6</sub> ), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                  |
|-----------------|---|--------|------------------------|--|------------------------|--|------------------|
|                 | 24 ч                                    | 96 ч   | 7 сут                  | 3 ч  | 24 ч                   | 6 ч  | 24 ч             |
| <b>МУНТ-2.1</b> | 214,8<br>(203,5–227,0)                  | ~359,8 | –                      | 29,8<br>(29,3–30,3)  | 24,3<br>(23,9–24,6)    | 27,4 (26,9–27,8)   | 23,4 (23,2–23,7) |
| <b>МУНТ-2.2</b> | 195,8<br>(194,5–227,0)                  | ~344,4 | ~560                   | 56,2<br>(54,2–58,3)  | 42,1<br>(41,6–52,8)    | 81,4 (78,2–84,7)   | 52,7 (51,4–54,1) |
| <b>УНВ-1.1</b>  | –                                       | > 1000 | 137,6<br>(135,0–140,2) | 94,3 (91,2–97,6)   | 154,4<br>(150,3–158,7) | 65,4 (62,1–68,8)   | 41,7 (40,2–43,2) |
| <b>УНВ-1.2</b>  | –                                       | –      | 170<br>(168,9–171,2)   | –  | 297,8<br>(294,0–301,6) | 70,1 (67,4–72,9)   | 55,5 (55,0–56,1) |

*Примечание.* \* Здесь и в табл. 4–7 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

\*\* Здесь и в табл. 4–7 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC<sub>6</sub>, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.

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

Образец МУНТ-2.2 проявлял большую ингибирующую активность в отношении роста водорослей *H. akashiwo*, чем МУНТ-2.1. Образец с большим количеством примесей Ni УНВ-1.2 проявлял большую ингибирующую активность, чем УНВ-1.1. Наиболее токсичным образцом с острой и хронической токсичностью были МУНТ-2.2. 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.

Таблица 5 – Результаты биоиспытаний углеродных наночастиц на микроводорослях *H. akashiwo*

| Твердые частицы | Выживаемость, EC <sub>50</sub> * (мг/л) |        |                        | Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                        | Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC <sub>6</sub> ), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                     |
|-----------------|---|--------|------------------------|--|------------------------|--|---------------------|
|                 | 24 ч                                    | 96 ч   | 7 сут                  | 3 ч  | 24 ч                   | 6 ч  | 24 ч                |
| <b>МУНТ-2.1</b> | 123,1<br>(121,0–125,2)                  | > 1000 | ~1000                  | 55,1<br>(53,4–56,4)  | 38,4<br>(38,7–40,1)    | 39,6<br>(38,9–40,4)  | 21,6<br>(21,4–21,7) |
| <b>МУНТ-2.2</b> | 154,3<br>(153,7–154,9)                  | > 1000 | ~855                   | 83 (78,9–87,3)   | 40,9<br>(40,3–41,5)    | 65,2<br>(63,1–67,5)  | 37,4<br>(36,4–38,3) |
| <b>УНВ-1.1</b>  | –                                       | –      | 110,6<br>(107,5–113,8) | 51,2<br>(50,3–52,0)  | 82,5<br>(82,0–83,1)    | 46<br>(44,4–47,7)  | 31,4<br>(30,5–32,2) |
| <b>УНВ-1.2</b>  | –                                       | –      | 135,8<br>(133,5–138,2) | Увеличение на 20–25 %**  | 168,1<br>(164,1–172,2) | 48<br>(47,0–49,1)  | 51,9<br>(51,3–52,4) |

Для *C. muelleri* увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла отмечено для образцов МУНТ-2.1 и УНВ-1.1 при концентрации 100 мг/л.

Таблица 6 – Результаты биоиспытаний углеродных наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

| Твердые частицы | Выживаемость, EC <sub>50</sub> * (мг/л) |        |       | Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                         | Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC <sub>6</sub> ), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                        |
|-----------------|---|--------|-------|--|-------------------------|--|------------------------|
|                 | 24 ч                                    | 96 ч   | 7 сут | 3 ч  | 24 ч                    | 6 ч  | 24 ч                   |
| <b>МУНТ-2.1</b> | 124,2<br>(119,0–129,7)                  | ~313   | ~318  | 105,8<br>(100,5–111,6)   | ~733                    | 38,8<br>(38,0–39,7)  | 60,9<br>(58,8–63,1)    |
| <b>МУНТ-2.2</b> | 98,4<br>(93,8–103,2)                    | > 1000 | ~680  | 45,8<br>(45,1–46,6)  | 136,5<br>(131,7–141,5)  | 60,4<br>(60,0–60,8)  | 39,6 (38,9–40,4)       |
| <b>УНВ-1.1</b>  | 126<br>(122,9–129,3)                    | –      | ~830  | 59,3<br>(58,5–60,1)  | > 1000                  | 39,83<br>(39,0–40,7)   | 33,8 (33,2–34,5)       |
| <b>УНВ-1.2</b>  | 137,7<br>(133,7–141,9)                  | ~601   | ~428  | Увеличение на 15–18 %*   | Увеличение на 10–25 %** | 60,2<br>(59,0–61,3)  | 223,2<br>(222,5–223,9) |

Для *P. purpureum* на фотосинтез микроводоросли наиболее выраженный эффект проявили УНВ-1.1

Таблица 7 – Результаты биоиспытаний углеродных наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

| Твердые частицы | Выживаемость, EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                        |                        | Эстеразная активность (изменение интенсивности флуоресценции FDA), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                  | Мембранный потенциал (изменение интенсивности флуоресценции DiOC <sub>6</sub> ), EC <sub>50</sub> * (мг/л) |                         |
|-----------------|---|------------------------|------------------------|--|------------------|--|-------------------------|
|                 | 24 ч                                    | 96 ч                   | 7 сут                  | 3 ч  | 24 ч             | 6 ч  | 24 ч                    |
| <b>МУНТ-2.1</b> | 38,5<br>(37,6–39,5)                     | 28,7<br>(28,1–29,3)    | 36,1<br>(35,2–37,0)    | 82,7<br>(80,9–84,6)  | ~423             | 53,9<br>(53,4–54,5)  | 208,6<br>(202,9–214,5)  |
| <b>МУНТ-2.2</b> | 42,2<br>(37,6–39,5)                     | 178,3<br>(175,8–180,9) | ~415                   | 16,5<br>(16,1–16,8)  | 78,6 (75,7–81,5) | 213,2<br>(209,7–216,8)   | 86,8 (84,6–89,1)        |
| <b>УНВ-1.1</b>  | 133,5<br>(132,9–134,1)                  | 39,5<br>(38,3–40,7)    | 61,5<br>(60,2–62,8)    | –  | ~654~            | ~359   | увеличение на 20–35 %** |
| <b>УНВ-1.2</b>  | 262,1<br>(257,1–267,3)                  | 106,1<br>(104,9–107,3) | 246,4<br>(234,7–259,0) | –  | –                | ~692   | ~479                    |

*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.

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. Одновременно наблюдается снижение концентрации клеток со жгутами, увеличивается количество шаровидных неподвижных клеток (планозиготы) и замедляется двигательная активность клеток.

#### **Воздействие многослойных углеродных наночастиц на беспозвоночных.**

Мы исследовали влияние углеродные наночастицы 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*);

Развитие личинок морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) в эксперименте происходило сходно с контролем, достоверное отличие от контроля выявлено в только в растворах МУНТ-1.1 с самыми большими концентрациями (до 100 мг/л)

Хронический эксперимент влияния МУНТ-1.1 и МУНТ-2.1 на морского ежа в тех же концентрациях показал следующие результаты (рис. 1).

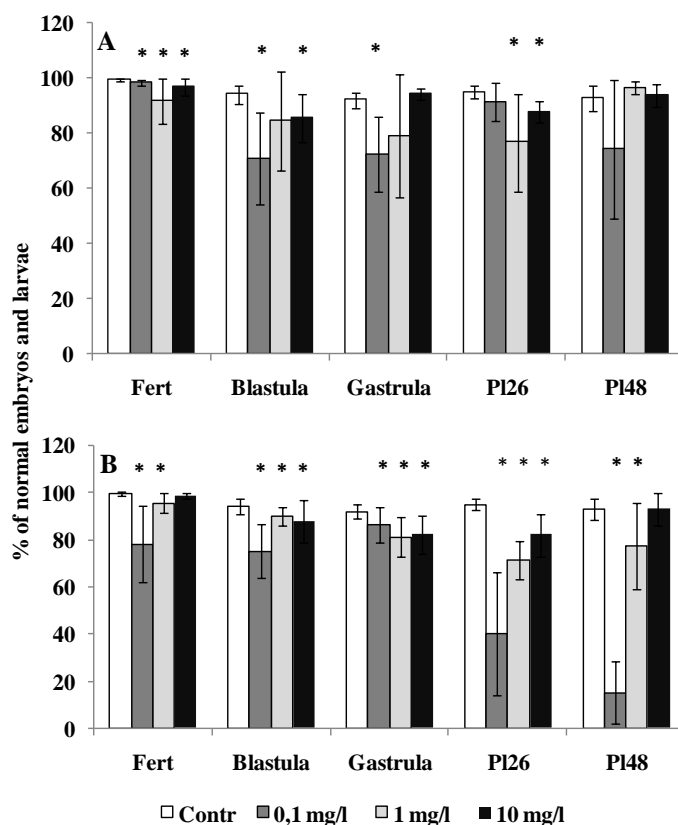


Рисунок 1 – Влияние МУНТ в концентрациях 0,1, 1,0, 10,0 и 100,0 мг/л нормальных эмбрионов и личинок морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) в течение 5 сут: А – МУНТ-1.1, В – МУНТ-2.1

Во всех экспериментах каких-то особых аномалий развития не было (табл. 8), наблюдалось лишь некоторое отставание, наиболее заметное на стадии гастролы 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 8 – Количество (в %) нормально развивающихся в растворах МУНТ эмбрионов и личинок (n =8)

| Концентрация МУНТ, мг/л | Стадии развития                     |             |             |                |                 |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|----------------|-----------------|
|                         | Образование оболочки оплодотворения | Бластула    | Гастролы    | 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     |

Примечание. \* 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) и два типа углеродных нановолокон (УНВ-1.1, УНВ1.2). Динамика нарушения развития и гибель яйцеклеток при воздействии наночастиц в концентрациях 10 и 100 мкг/мл показаны на (рис. 2, табл. 9).

Таблица 9 – Средние расчетные концентрации (EC<sub>50</sub>) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

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

Наименьшая токсичность отмечена для образцов многослойных углеродных нанотрубок МУНТ-2.2, МУНТ-2.3.

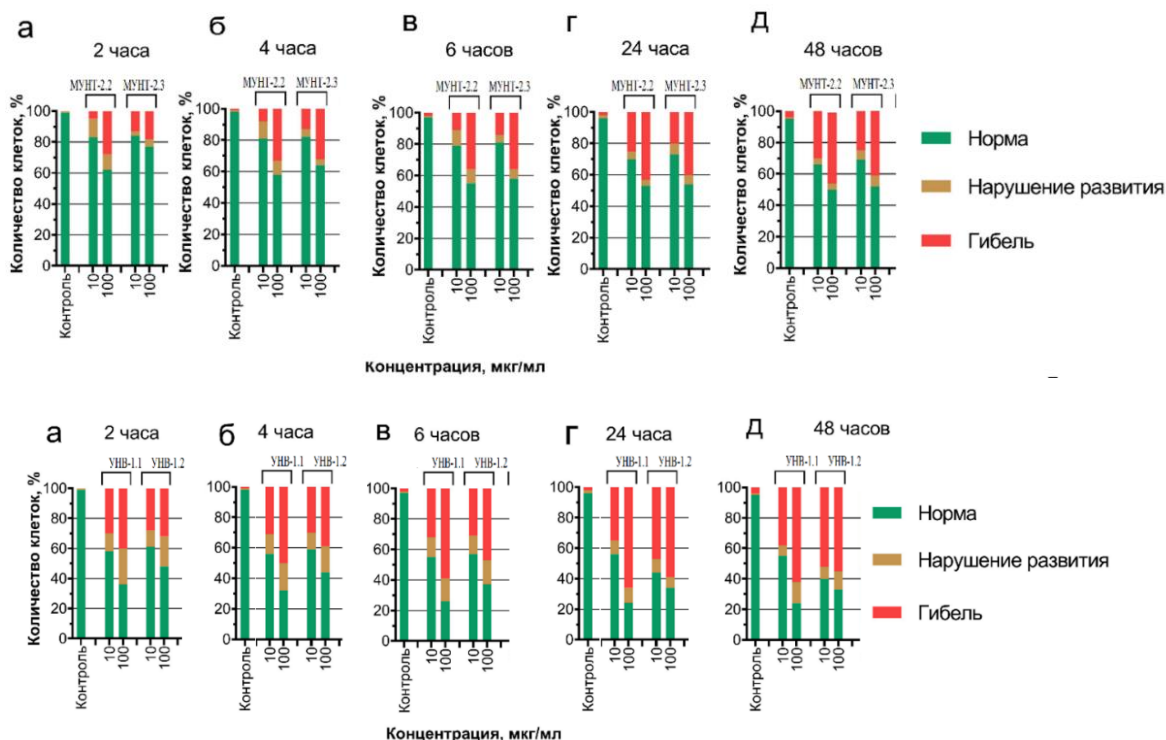


Рисунок 2 – Гибель и нарушение развития эмбрионов морского ежа *S. intermedius* при воздействии углеродных наночастиц (МУНТ и УНВ) в концентрациях 10 и 100 мкг/л:

а – 2 ч; б – 4 ч; в – 6 ч; г – 24 ч; д – 48 ч

В целом изученные органы-мишени *Modiolus modiolus*, (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.

### **Воздействие МУНТ на гемоциты морских моллюсков**

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия МУНТ представлены на рисунке 3.

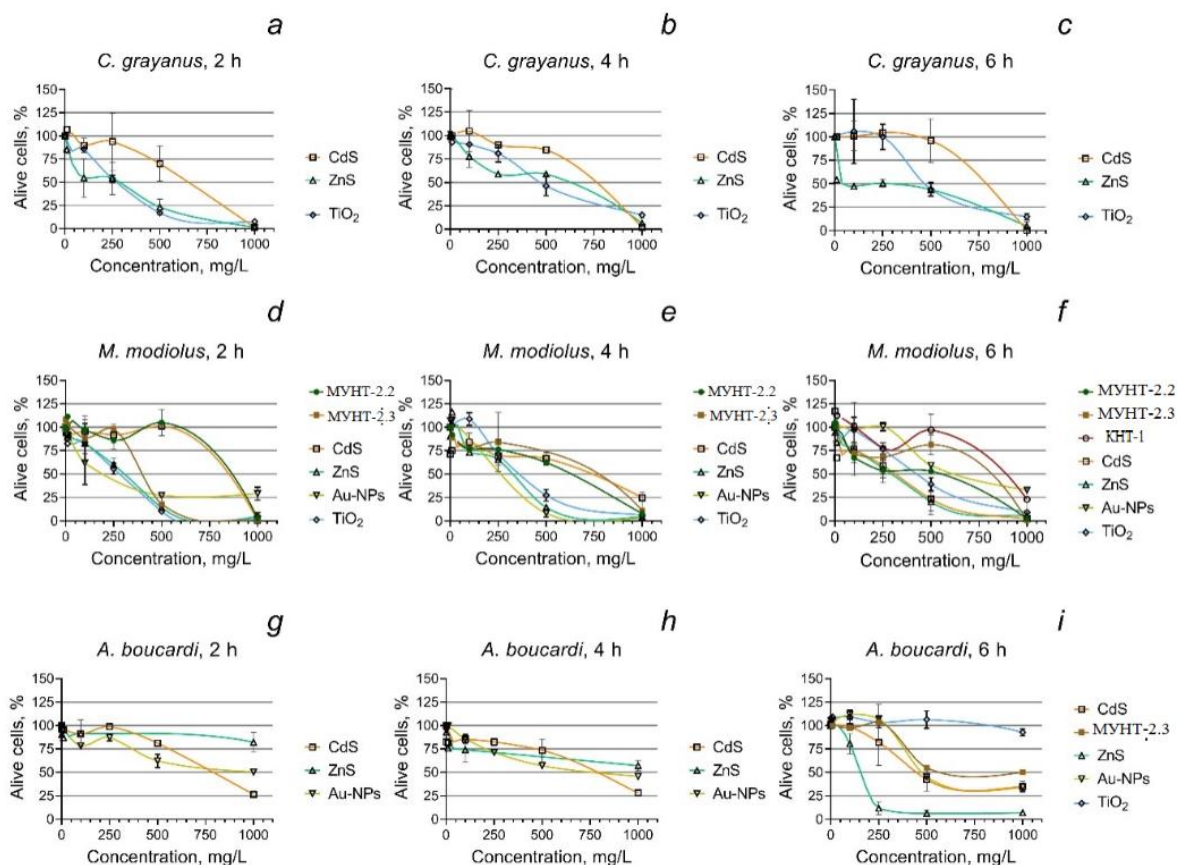


Рисунок 3 – Жизнеспособность клеток гемоцитов моллюсков *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* после обработки НЧ: а, б, с – изменения общего количества живых гемоцитов *C. grayanus* соответственно через 2, 4 и 6 ч воздействия на НЧ; **д, е, ф** – изменения общего количества живых гемоцитов *M. modiolus* после 2, 4 и 6 ч воздействия НЧ; **г, h, и** – изменения в общем количестве живых гемоцитов *A. boucardi* после 2, 4 и 6 ч воздействия НЧ

В целом гемоциты *M. modiolus* были углеродных 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. 3, d-f). Кроме того, образец МУНТ-2.3 значительно повлиял на гемоциты *A. boucardi* после 6 ч воздействия (рис. 3, i). Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия УНВ не наблюдалось.

### **Влияние углеродных наночастиц на насекомых**

Изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) следующих материалов: МУНТ 2 вида – МУНТ-2.2, МУНТ-2.3 и УНВ-1.1 в концентрации: 100 мг/мл. При изучении тканей пищеварительной систем *Alloperla deminuta* не выявлено видимых патологических изменений. 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.

### **Влияние УНВ-1.2 на три вида беспозвоночных типа членистоногих**

В экспериментальных группах *Gammarus suifunensis*, *D. cryptomeria*, Chironomidae (*Diamesa* sp.) не обнаружено видимых повреждений ткани. Признаков воспаления, дистрофии и некроза в тканях дыхательной, кровеносной, нервной, выделительной и пищеварительной систем обнаружено не было. В апикальной части эпителиальных клеток имелось большое количество включений (предположительно конгломератов нановолокон) (рис. 4, В).

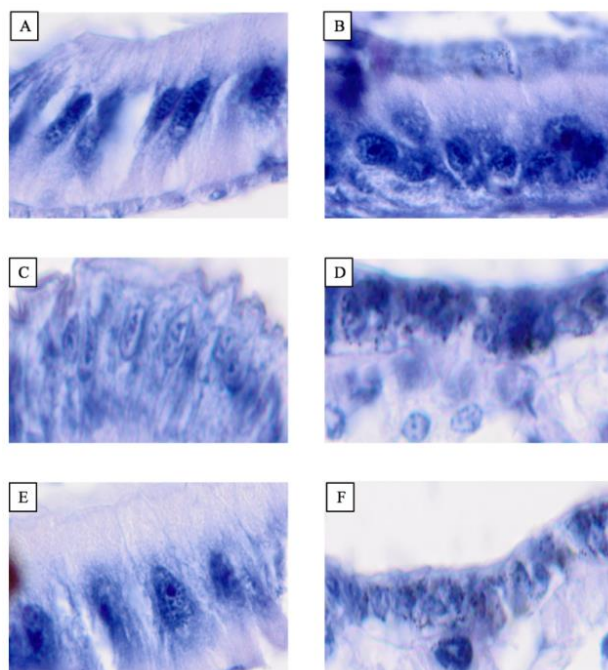


Рисунок 4 – Кишечный эпителий *Gammarus suifunensis* в группе Контроль (гематоксилин-эозин 400×) (А), в группе Эксперимент (гематоксилин-эозин 400×) (В); кишечный эпителий Chironomidae (*Diamesa* sp.) в группе Контроль (гематоксилин-эозин 400×) (С), в группе Эксперимент (гематоксилин-эозин 400×) (D); эпителий кишечника *Drunella cryptomeria* в группе Контроль (гематоксилин-эозин 400×) (Е), в группе Эксперимент (гематоксилин-эозин 400×) (F)

### **Влияние МУНТ на выделительную систему и желудочно-кишечный тракт мышей**

В экспериментальной группе тучные клетки, мигрирующие в собственную пластинку, были идентифицированы после 1 дня перорального введения МУНТ-2.1. 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. На 3-й день МУНТ-2.1 были обнаружены в глубоких слоях и не только в цитоплазме эпителиоцитов, но и в ядрах. 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

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. Инфляция эритроцитами развивалась в областях, прилегающих к канальцам.

Лимфоидная ткань была замечена в почечной паренхиме и соединительной ткани; фолликулы формировались, с реактивными зонами. 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.

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.

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.

#### ***Влияние углеродных наночастиц на показатели высшей активности нервной системы у крыс***

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.

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. К 10-му дню воздействия на крыс линии Вистар МУНТ полностью отменило их исследовательскую активность.

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

контролем. 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.

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.

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

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. Так, в ткани почек у крыс группы УНВ-2.1 обнаружены дистрофические изменения и некрозы.

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

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. Сосуды полнокровны, но стаза не отмечается. В слизистой оболочке кишечника в группах УНВ-2.2, УНВ-1.3, УНВ-2.1 наблюдается выраженное слизеобразование. В группе УНВ-1.3 и УНВ-2.1 в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликул. Ткани печени во всех экспериментальных группах не отличаются от контрольной.

## **ГЛАВА 5. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛОВ**

В **Главе 5** описаны ответные реакции микроорганизмов, беспозвоночных и млекопитающих, вовлеченных в исследование на наночастицы на основе металлов.

***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*).

Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC<sub>6</sub> снижается на 50 % (EC<sub>50</sub>) в сравнении с контролем. Величины EC<sub>50</sub>, полученные на основе данных проточной цитометрии и рассчитанные в программном пакете GraphPad Prism 7.04, представлены в табл. 10–13.

Таблица 10 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *A. ussuriensis*

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

*Примечание.* \* Здесь и в табл. 10–13 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

\*\* Здесь и в табл. 10–13 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC<sub>6</sub>, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.

Таблица 11 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *H. akashiwo*

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

CdS и ZnS показали снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла для водорослей вида *Chaetoceros muelleri*.

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 12 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

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

Таблица 13 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

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

### **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) были протестированы нанокристаллы сульфидов кадмия и цинка (CdS, ZnS), наночастицы золота (Au) и наночастицы диоксида титана (TiO<sub>2</sub>).

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 (табл. 14).

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.

**Воздействие металлических наночастиц на гемоциты морских моллюсков**

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия металлических НЧ представлены на рисунке 3. НЧ на основе металлов (CdS, ZnS, Au НЧ и TiO<sub>2</sub>) показали наибольшую цитотоксичность среди всех испытанных образцов. НЧ CdS и ZnS продемонстрировали выраженный цитотоксический эффект на гемоциты всех трех видов моллюсков (рис. 3). Более того, токсичность образца НЧ ZnS для *C. grayanus* и *A. boucardi* значительно увеличилась после 6 ч воздействия рис. 3, с, i. Au-НЧ сильно повлияли на гемоциты двух видов, а именно *M. modiolus* и *A. boucardi* (рис. 3 d-i), но не оказывал влияния на *A. boucardi* (рис. 3 g, h, i). TiO<sub>2</sub> НЧ вызывали значительную смертность гемоцитов *C. grayanus* и *M. modiolus* (рис. 3 a-f). Но для *A. boucardi* НЧ TiO<sub>2</sub> проявлял относительно низкий цитотоксический эффект, который наблюдался только после 6 ч экспозиции до самой высокой концентрации НЧ, 1000 мг/л (рис. 3 i).

Таблица 14 – Средние расчетные концентрации (EC<sub>50</sub>) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

| Образец наночастиц | Оплодотворяемость яйцеклеток, EC <sub>50</sub> , мкг/мл* | Гибель эмбрионов, EC <sub>50</sub> , 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 <sub>2</sub>   | 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 EC<sub>50</sub> с доверительной вероятностью 95 %; \*p < 0,0001; \*\*p < 0,001; \*\*\*p < 0,05.

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. Au НЧ снижали мембранополаризацию гемоцитов *C. grayanus* и *M. modiolus* выше, чем поляризация клеток *A. boucardi*. TiO<sub>2</sub> вызывал гиперполяризацию мембран клеток *M. modiolus*.

**Влияние наночастиц на основе металлов на беспозвоночных типа членистоногих**

Изучалось влияние на личинки веснянки *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) следующих материалов:  $TiO_2$ ; Au; CdS; ZnS в концентрации: 100 мг/мл. В экспериментальных группах ( $TiO_2$ ; Au; CdS; ZnS) *Alloperla deminuta* 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. Наибольшее увеличение морфометрических показателей наблюдалось в группах металлических наночастиц Au,  $TiO_2$ , ZnS (рис. 5). Эти данные подтверждают ранее полученные результаты о низкой чувствительности пресноводных насекомых к загрязнению наночастицами.

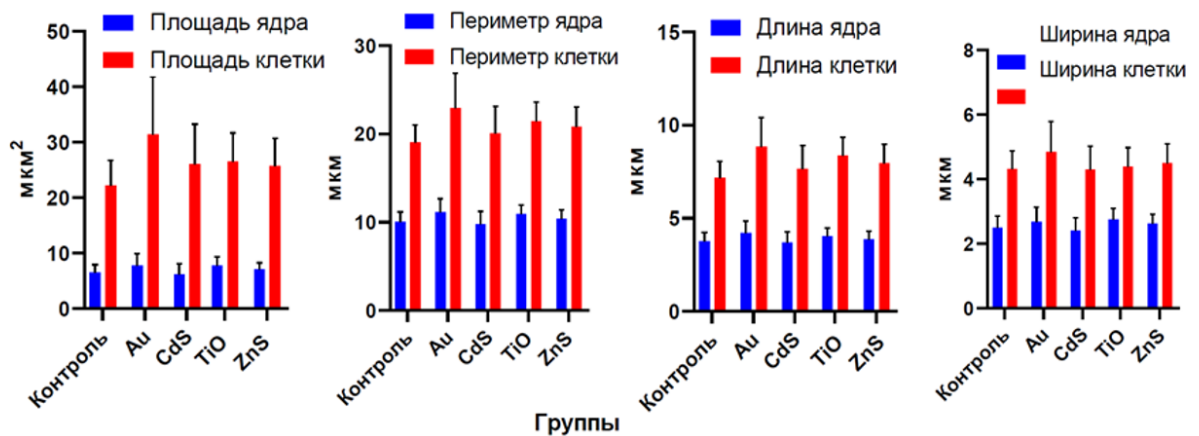


Рисунок 5 – Влияние наночастиц металлов на изменения размеров ядер и клеток кишечного эпителия

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

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. 6, а).

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. 6, 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. 6, г, д) до полного заполнения цитоплазмы НЧ на 4-й день.

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 интернализованных 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.

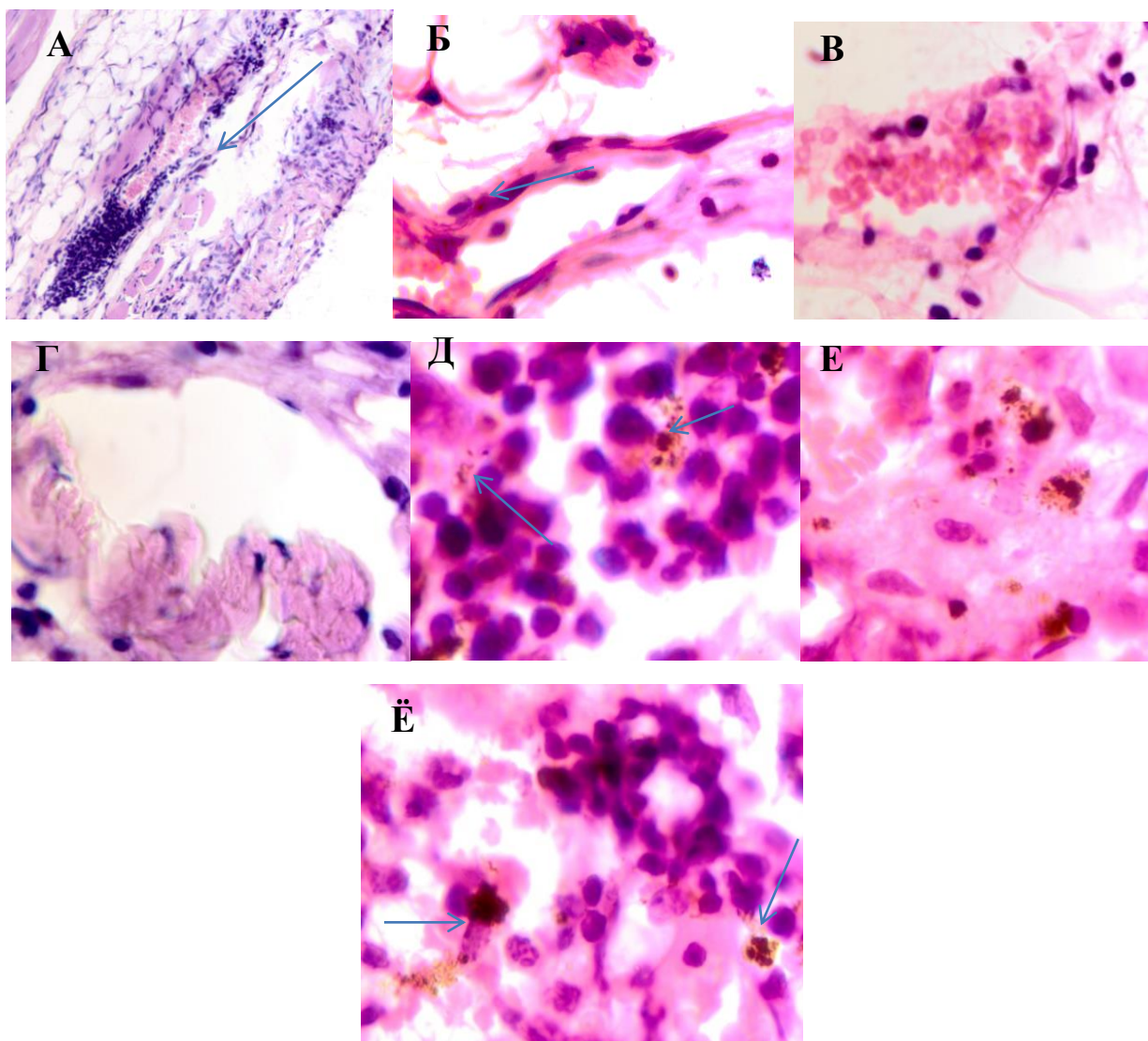


Рисунок 6 – Срезы эндотелия и макрофаги мышцы в месте инъекции наночастиц золота. Окрашивание гематоксилином и эозином, 400×: **а** – периартериальная лейкоцитарная инфильтрация соединительной ткани в месте введения наночастиц золота; **б** – эндотелиальная гипертрофия (*стрелки*); **в** – гипертрофия эндотелия и разрушение базальной мембраны эндотелиоцитов; **г** – активный макрофаг с введенным наночастиц золота; **д** – одиночные макрофаги с фагоцитозом наночастиц; **е** – свободные наночастицы **ё** - наночастицы, фагоцитируемые макрофагами

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.

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

В Главе 6 описаны ответные реакции микроорганизмов, беспозвоночных и млекопитающих, вовлеченных в исследование, на воздействие минеральных синтетических и природных наночастиц.

### *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*).

Нами были определены концентрации, при которых скорость роста клеток, интенсивность флуоресценции FDA и интенсивность флуоресценции DiOC<sub>6</sub> снижается на 50 % (EC<sub>50</sub>) в сравнении с контролем. Величины EC<sub>50</sub>, полученные на основе данных проточной цитометрии, представлены в табл. 15–18. Результаты теста на ингибирование роста водорослей *H. akashiwo* показали, что острая токсичность всех образцов зависела от дозы (рис. 7).

Таблица 15 – Результаты биоиспытаний минеральных синтетических наночастиц на микроводорослях *A. ussuriensis*

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

*Примечание.* \* Здесь и в табл. 15–18 погрешность выполненных анализов оценена с использованием доверительного интервала с уровнем доверия 95 % (границы доверительного интервала приведены в скобках).

\*\* Здесь и в табл. 15–18 в случаях, когда при воздействии исследуемых веществ наблюдался прирост популяции микроводорослей или увеличение интенсивности флуоресценции FDA и DiOC<sub>6</sub>, данные приведены для концентрации частиц 100 мг/л в сравнении с группой контроля.



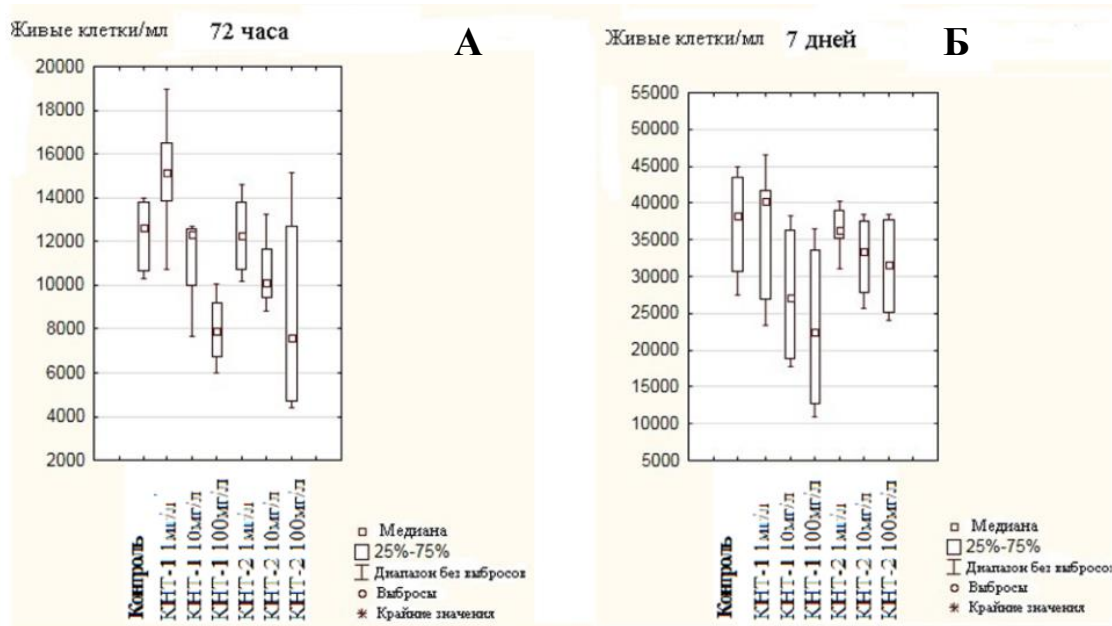


Рисунок 7 – Выживание морских микроводорослей *H. akashiwo* в течение 72 ч (А) и 7 дней (Б) при воздействии различных концентраций кремниевых нанотрубок (КНТ), при 20 °С и 12 : 12 ч светло-темный цикл

Таблица 16 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *H. akashiwo*

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

Таблица 17 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *C. muelleri*

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

КНТ показали высокую токсичность для микроводорослей и отсутствие клеток с аномальной формой. Для микроводоросли *A. ussuriensis* КНТ-1, КНТ-2, показали снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла для данного вида.

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 18 – Результаты биоиспытаний наночастиц на микроводорослях *P. purpureum*

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

#### **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*);

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 EC<sub>50</sub>, при которых оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа снижается на 50 % и происходит гибель 50 % эмбрионов в сравнении с контролем (табл. 19).

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 19 – Средние расчетные концентрации (EC<sub>50</sub>) ингибирования оплодотворяемости яйцеклеток и гибели эмбрионов морского ежа *S. intermedius*

| Образец наночастиц | Оплодотворяемость яйцеклеток, EC <sub>50</sub> , мкг/мл* | Гибель эмбрионов, EC <sub>50</sub> , 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<sub>50</sub> с доверительной вероятностью 95 %; \*p < 0,0001; \*\*p < 0,001; \*\*\*p < 0,05.

Изменения жизнеспособности клеток гемоцитов трех видов морских двустворчатых моллюсков после 2, 4 и 6 ч воздействия минеральных НЧ представлены на рис. 3. В целом гемоциты *M. modiolus* были чувствительны к обоим типам минеральных синтетических наночастиц. Только *M. modiolus* показал токсичность КНТ-1 после 6 ч воздействия. Влияние НЧ на мембранную поляризацию гемоцитов *C. grayanus*, *M. modiolus* и *A. boucardi* представлено в виде тепловой карты (рис. 3). Кремниевые нанотрубки КНТ-1 вызывали наибольшую мембранную деполаризацию 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.

#### ***Влияние минеральных наночастиц на беспозвоночных типа членистоногих***

В экспериментальных группах (КНТ-1 и КНТ-2) *Alloperla deminuta* 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.

#### ***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.

Как видно из морфометрии (табл. 20), выраженные некротические изменения в эпителии кишечника наблюдаются в группах с измельчением цеолитов Люльинского, Куликовского и Холинского месторождений в планетарной мельнице до нанодиапозона.

Таблица 20 – Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в разных экспериментальных группах

| Группа   | Длина ядра, мкм   | Ширина ядра, мкм | Площадь ядра, мкм <sup>2</sup> | Длина клетки, мкм | Ширина клетки, мкм | Площадь клетки, мкм <sup>2</sup> |
|----------|---|------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|
| 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 |                  |                                |                   |                    |                                  |

***Влияние природных наночастиц (цеолитов) при внутримышечном введении) на мышей***

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. 8, а). Наблюдали макрофаги с большим количеством лизосом с частицами цеолитов в цитоплазме (рис. 8, б).

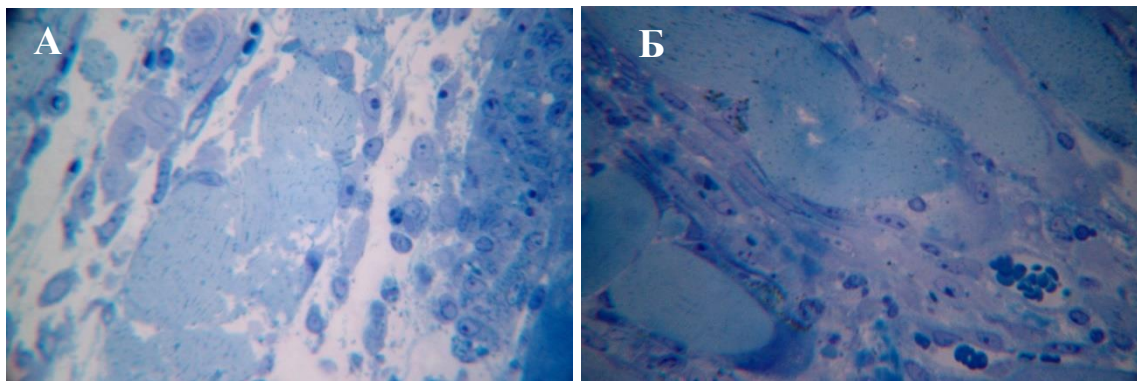


Рисунок 8 – Срезы мышечных волокон с деструкцией, повышенное содержание лимфоцитов и макрофагов (а), наличие макрофагов с увеличенным содержанием лизосом с частицами цеолитов (б) в мышечной ткани бедра мыши при введении частиц цеолитов Вангинского месторождения. Окраска толуидиновым синим. Увеличение 400×

В печени животных, которым вводились цеолиты, наблюдали гепатоциты со средне- и крупнокапельной вакуольной дистрофией токсического генеза. Отмечали стаз эритроцитов в синусоидах и крупных сосудах печени. 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 отежные и застойные явления в структуре почки, из-

за чего практически не определялись просветы проксимальных и дистальных канальцев. Эпителий канальцев местами был некротизирован

## **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**

### *Повреждающее действие наночастиц на клеточном уровне и устойчивость одноклеточных организмов*

Известно, что ингибирование роста тесно связано с затенением УНТ и агломерацией клеток водорослей. Мы не заметили прямой связи между затенением и торможением роста, но в случае нановолокон мы наблюдали, как они агломерировались с ними и образовывали большие кластеры. 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. Вероятно, в случае УНВ ингибирующий эффект вызван только примесями.

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.

Мы предполагаем, что большая токсичность КНТ по сравнению с МУНТ обусловлена тем, что они меньше и более гидрофильны. 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.

В то же время углеродные нановолокна в концентрации 100 мг/л почти не проявляли токсичности, хотя наблюдалось значительное количество клеток неправильной формы. 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 ком-

понентами 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. 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.

Результаты нашего исследования позволяют сделать следующие выводы. МУНТ по отношению к морским микроводорослям *Pseudo-nitzschia pungens* и *Isochrysis galbana* проявляют токсичность в исследованных концентрациях. *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.

Концентрация МУНТ 10 мг/мл на *Isochrysis galbana* 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. В пользу механизма токсического действия нанотрубок через поверхностные мембранные эффекты, опосредованные системой вторичных посредников, можно привести факт отсутствия многослойных трубок внутри водорослей.

#### ***Повреждающее действие наночастиц на органно-тканевом и органно-системном уровнях и устойчивость беспозвоночных и млекопитающих***

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.

Кроме того, необходимо отметить, что наночастицы золота, 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.

Кроме того, на (Таб. 15) 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).

Нами было изучено влияние металлических (CdS, ZnS, TiO<sub>2</sub>, 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 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 составляет 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.

Только гемоциты *M. modiolus* продемонстрировали цитотоксический ответ под влиянием КНТ-1 после 6 ч воздействия (рис. 3). Более высокая токсичность КНТ-1 по сравнению с НЧ КНТ-2 коррелирует с меньшим размером и значительно более развитой площадью поверхности.

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 деполаризация 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.

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*. 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).

В отличие от клеток *C. grayanus* и *A. boucardi*, гемоциты *M. modiolus* под влиянием НЧ TiO<sub>2</sub> реагировали мембранной гиперполяризацией. Такой ответ может быть связан с генерацией АФК фотоактивными НЧ TiO<sub>2</sub> (Haynes et al., 2017) и дальнейшим окислительным расстройством. Гемоциты *A. boucardi* были толерантными к НЧ TiO<sub>2</sub> после 2 и 4 ч воздействия), но незначительный цитотоксический эффект наблюдался после 6-часовой обработки.

Результаты наших исследований продемонстрировали цитотоксическое влияние Au НЧ на гемоциты *M. modiolus* и *A. boucardi*. Интересно, что гемоциты *C. grayanus* выявили толерантность к Au НЧ, но показали значительную деполяризацию мембран.

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. 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.

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.

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.

Активный захват агрегатов наночастиц иллюстрируется гистологическим анализом: через 24 ч инкубации в просвете кишечника *Modiolus modiolus* в избытке наблюдались свободно лежащие агрегаты размером до 150 мкм.

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.

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.

Наше исследование демонстрирует наличие гистопатологических изменений в жабрах мидий, подвергающихся воздействию ОУНТ. Кроме того, в эпителии жабр наблюдались явления, морфологически связанные с апоптозом.

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 настоящем исследовании в течение 7 дней мы рассмотрели возможное влияние УНВ-1.2 на состояние пищеварительной системы трех видов беспозвоночных. Гистологическое исследование кишечника у всех видов беспозвоночных показало большое количество включений в апикальной части эпителиальных клеток, которые предположительно поглощаются УНВ. 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 высокоструктурированным 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 биодegradации в пищеварительном тракте и количество их дефектов значительно увеличивалось.

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.

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. Выраженного токсического эффекта от МУНТ-2.2, МУНТ-2.3; УНВ-1.1 мы не наблюдали. Реакция эпителия кишечника *Alloperla deminuta* (лат. Plecoptera) на НЧ TiO<sub>2</sub>; Au; CdS; ZnS более выраженная. Хотя морфометрические показатели достоверно не отличались от показателей группы Контроль, но наблюдалась тенденция к увеличению размеров клеток эпителия. Выраженного токсического эффекта от TiO<sub>2</sub>, Au, CdS и ZnS мы также не наблюдали.

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. Выраженного токсического эффекта от КНТ-1 и КНТ-2 мы также не наблюдали.

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. Крысы, обработанные МУНТ, продемонстрировали пониженную когнитивную способность.

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.

Повышенный стресс негативно влияет на исследовательскую деятельность; однако развитие локального воспаления головного мозга из-за воздействия МУНТ также может быть причиной развития когнитивных нарушений.

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.

В слизистой оболочке желудка 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 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 и УНВ-2.1 в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликулов.

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 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  $\beta$  и IL-6 в кровообращении.

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 $\beta$ , IL-8, IL-18. Как описано, без специальной функционализации УНВ не будут преодолевать гематоэнцефалический барьер и не будут оказывать прямого токсического воздействия на ЦНС.

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.

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 гиполокомоции, но не было никаких изменений в параметрах других поведенческих категорий, включая отсутствие повышенной реакции замораживания.

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.

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.

Согласно нашим результатам, после подкожного введения НЧ золота мышам, через стенку сосудов мигрировали макрофаги, содержащие НЧ золота в цитоплазме, но не сами частицы. 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 и отсутствие ангиогенеза в опухоли обусловлены дезактивацией VEG-продуцирующих макрофагов в результате фагоцитоза большого количества НЧ.

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 цеолитового туфа разных месторождений подтверждается данными морфометрии.

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 рисунке 9.

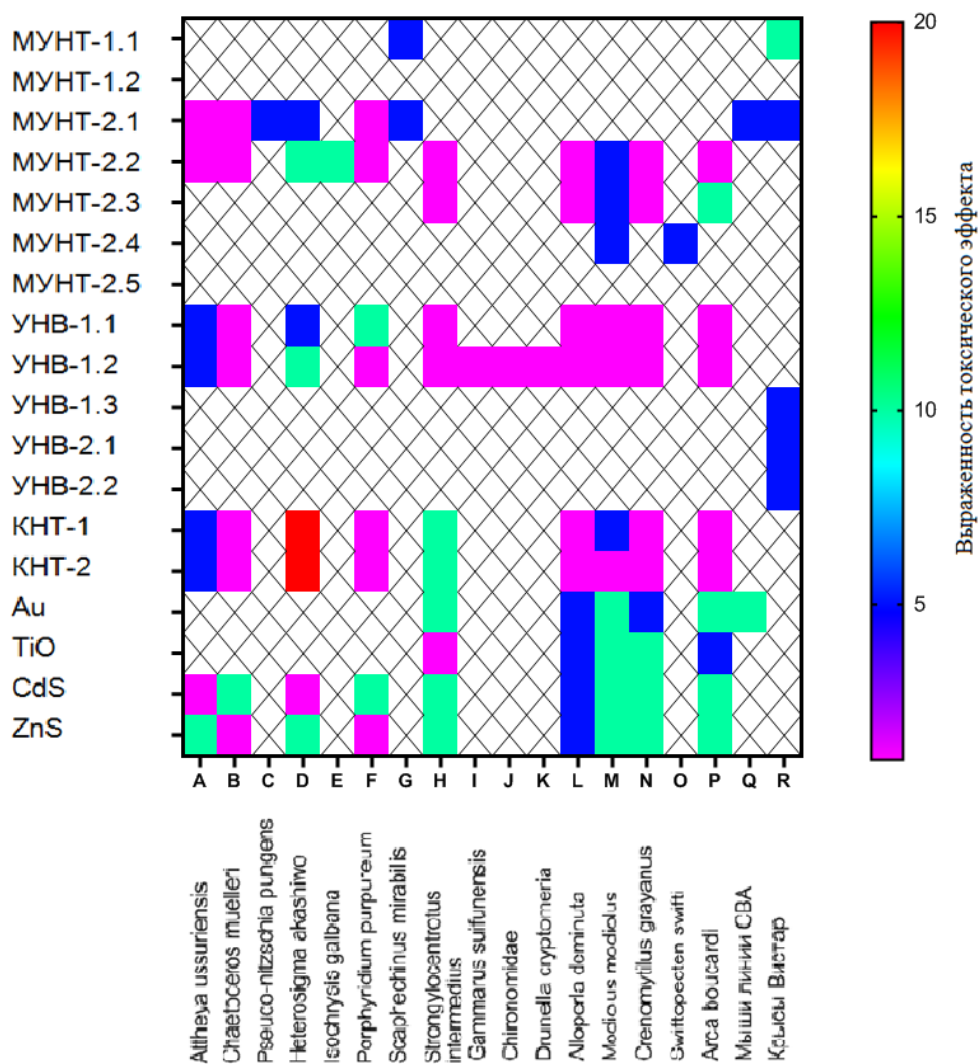


Рисунок 9 – Сравнение экотоксикологических эффектов углеродных, кремниевых и металлических наночастиц

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.

## 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 биоразложению 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Монографии:

1. Голохваст С., Чайка В.В., Сергеевич А.А., Борисов С.Ю., Памирский И.Э. Биологические свойства нано- и микрочастиц минералов. – Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2013. 108 с. ISBN 978-5-7444-3282-9
2. Чайка В.В., Пикула К.С., Гусев А.А., Голохваст К.С. Введение в нанотоксикологию. – Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2020. 450 с.

### Публикации в российских рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Голохваст К.С., Кисилев Н.Н., Чайка В.В., Паничев А.М., Никифоров П.А., Ведягин А.А., Мишаков И.В., Памирский И.Э., Гульков А.Н. Эколого-морфологические особенности перорального пути поступления нано- и микрочастиц минералов // Известия Самарского научного центра РАН, 2011. – Т. 13, № 1 (5). – С. 1253–1255.
2. 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. Экоотоксикология нано- и микрочастиц минералов // Известия Самарского научного центра РАН, 2011 – Т. 13, № 1 (5). – С. 1256–1259.
3. Голохваст К.С., Киселев Н.Н., Чайка В.В., Паничев А.М., Никифоров П.А., Гульков А.Н. Влияние наночастиц цеолититов разных месторождений на морфологические параметры эпителиоцитов желудка мыши домашней *Mus musculus* // Вестник новых медицинских технологий, 2012. – Т. XIX, № 2. – С. 108–110.
4. Голохваст К.С., Киселев Н.Н., Чайка В.В., Паничев А.М., Никифоров П.А., Гульков А.Н. Влияние наночастиц цеолититов разных месторождений на эпителиоциты кишечника мыши // Цитология, 2012. – Т. 54, № 9. – С. 673–674.

5. Голохваст К.С., **Чайка В.В.**, Кузнецов В.Л., Рева Г.В., Кусайкин М.И., Захаренко А.М., Киселев Н.Н., Паничев А.М. Иммуногенность многослойных углеродных нанотрубок // Вестник РГМУ, 2013. – № 1. – С. 249–250.
6. Голохваст К.С., Кузнецов В.Л., Кусайкин М.И., Едумеева К.В., Мишаков И.В., Староконь Е.В., **Чайка В.В.**, Никифоров П.А., Паничев А.М., Гульков А.Н. Влияние некоторых синтетических и природных наночастиц на развитие личинок морского ежа // Нанотехнологии и охрана здоровья, 2013. – Т.5, № 2. – С. 36–40.
7. Голохваст К.С., **Чайка В.В.**, Борисов С.Ю., Киселев Н.Н. Свойства наночастиц, определяющие ответную реакцию организма // Аллергология и иммунология, 2013. – Т. 14, № 2. – С. 158.
8. Голохваст К.С., Бгатова Н.П., **Чайка В.В.**, Паничев А.М., Гульков А.Н. Влияние нано- и микрочастиц цеолитов на иммунный ответ при разных путях введения // Российский иммунологический журнал, 2013. – Т. 7(16), № 2–3. С.183-184.
9. Голохваст К.С., Бгатова Н.П., **Чайка В.В.**, Рева Г.В., Мишаков И.В., Киселев Н.Н., Паничев А.М., Гульков А.Н. Влияние нано- и микроразмерной фракции частиц цеолитов на организм мышей линии СВА при внутримышечном введении // Вестник новых медицинских технологий, 2013. – Т. XX, № 2. – С. 30–33.
10. Журавель Е.В., Лукьянова О.Н., Подгурская О.В., **Чайка В.В.**, Кузнецов В.Л., Голохваст К.С. Влияние многослойных углеродных нанотрубок (8-10 нм) на раннее развитие морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) при кратковременном культивировании // Цитология, 2013. – Т. 55, № 9. – С. 637–638.
11. Голохваст К.С., **Чайка В.В.**, Киселев Н.Н., Кузнецов В.Л., Паничев А.М., Гульков А.Н. Отличие токсических свойств наночастиц различного генеза при влиянии на эпителий кишечника // Морфология, 2013. – № 5. – С. 72-74.
12. Голохваст К.С., **Чайка В.В.**, Борисов С.Ю., Сергеевич А.А., Цыбанков С.А., Гамидов М.Г. Морфологическая оценка влияния частиц цеолитсодержащего туфа Куликовского месторождения размером 10-50 мкм на организм крыс линии Вистар при пероральном введении // Вестник новых медицинских технологий, 2013. – № 4. – С. 82–86.
13. Сергеевич А.А., Чайка В.В., Голохваст К.С., Хороших П.П. К механизмам биологической активности нано- и микрочастиц природных минералов в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий, 2013. – № 4. – С. 160–165.
14. Голохваст К.С., **Чайка В.В.** Влияние микрочастиц цеолитовых туфов месторождения Хонгуруу (Якутия) на бактерий // Проблемы освоения георесурсов Дальнего Востока Выпуск 4; Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал), 2014. – С. 22–25.
15. Саяпина Н.В., Сергеевич А.А., Баталова Т.А., Новиков М.А., Асадчева А.Н., **Чайка В.В.**, Голохваст К.С. Экологическая и токсикологическая опасность углеродных нанотрубок: обзор российских публикаций // Известия Самарского научного центра РАН, 2014. – Т. 16, № 5(2). – С. 949–953.
16. Голохваст К.С., Кузнецов В.Л., **Чайка В.В.**, Орлова Т.Ю. Влияние многослойных углеродных нанотрубок на морские микроводоросли в условиях культуры // Нанотехнологии и охрана здоровья, 2014. – № 2. – С. 24–29.



17. **Чайка В.В.**, Саяпина Н.В., Баталова Т.А., Сергиевич А.А., Мишаков И.В., Ведягин А.А., Новиков М.А., Голохваст К.С. Морфологическая оценка влияния разных типов углеродных нановолокон на некоторые внутренние органы (почки, селезенка) крыс линии Вистар // Известия Самарского научного центра РАН, 2014. – Т. 16, № 5 (4). – С. 1247–1250.

18. Голохваст К.С., **Чайка В.В.**, Сергиевич А.А., Саяпина Н.В., Баталова Т.А., Мишаков И.В., Ведягин А.А., Новиков М.А. Морфологическая оценка влияния углеродных нановолокон на органы пищеварения крыс линии Вистар при пероральном введении в течение 14 дней // Вестник новых медицинских технологий, 2016. – № 4. – 67-74

19. Виткина Т.И., Янькова В.И., Гвозденко Т.А., Кузнецов В.Л., Красников Д.В., Сидлецкая К.А., **Чайка В.В.**, Голохваст К.С. Механизм патологического действия многослойных углеродных нанотрубок с различным уровнем металлических примесей // Сибирский научный медицинский журнал, 2017. – Т. 37. – № 2. – С. 5–11.

#### Публикации в журналах, индексируемых БД Scopus, Web of Science:

20. 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 Multiwalled Carbon Nanotubes Received Orally during 6 Days on the Gastrointestinal Tract // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2013. Vol. 155. Issue 6. P. 788–792.

21. Reva G.V., Reva I.V., Yamamoto T., Usov V.V., Apanasevich V.E., Gul'kov A.N., Golokhvast K.S., Lomakin A.V., Krasnikov Yu.A., Novikov A.S., **Chaika V.V.** Reaction of Dermal Structures to Subcutaneous Injection of Gold Nanoparticles to CBA Mice // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2014. Vol. 156(4). P. 491–494.

22. Anisimova A.A., **Chaika V.V.**, Kuznetsov V.L., Golokhvast K.S. Study of the Influence of Multiwalled Carbon Nanotubes (12–14 nm) on the Main Target Tissues of the mollusk *Modiolus modiolus* (Bivalvia) // Nanotechnologies in Russia, 2015. Vol. 10, № 3–4. P. 278–287.

23. **Chaika V.V.**, Sayapina N.V., Batalova T.A., Sergievich A.A., Mishakov I.V., Vedyagin A.A., Novikov M.A., Agoshkov A.I., Petukhov V.I., Drozd V.A., Ugay S.M. Morphological assessment of influence of carbon nanofibers on digestive organs of wistar rats upon oral administration // Biology and Medicine, 2015. 7(2): BM-075-15 5 p.

24. Sayapina N.V., Batalova T.A., **Chaika V.V.**, Kuznetsov V.L., Sergievich A.A., Kolosov V.P., Perel'man Yu.M., Golokhvast K.S. Multi-Walled Carbon Nanotubes Increase Anxiety Levels in Rats and Reduce Exploratory Activity in the Open Field Test // Doklady Biological Sciences, 2015. Vol. 464. P. 223–225.

25. 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.

26. 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.A., Tsatsakis A.M., Fenga C., Golokhvast K.S. Influence of multi-walled carbon nanotubes on the cognitive abilities of Wistar rats // Experimental and Therapeutic Medicine, 2016. № 12. P. 1311–1318.

27. Anisimova A.A., Lukyanova O.N., **Chaika V.V.**, Kalitnik A.A., Danilenko S.A., Kuznetsov V.L., Golokhvast K.S. 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. 225–231.
28. Sayapina N.A., Batalova T.A., Sergievich A.A., Shtarberg M.A., Borodin E.A., Khoroshikh P.P., **Chaika V.V.**, Kodintsev V.V., Vedyagin A.A., Mishakov I.V., Henrich-Noack P., Tsatsakis A.M., Engin A.B., Golokhvast K.S. Oral application of carbon nanofibers in rats increases blood concentration of IL6 and IL10 and decreases locomotor activity // Experimental and Toxicologic Pathology, 2017. Vol. 50. P. 183–191.
29. 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.
30. Pikula K., Chernyshev V., Zakharenko A., **Chaika V.**, Greta W., Hai L., Hien T., Tsatsakis A., Golokhvast K. Toxicity assessment of particulate matter emitted from different type of vehicles on marine microalgae // Environmental Research, 2019. Vol. 179. Part A. 108785.
31. Pikula K., Kirichenko K., Zakharenko A., **Chaika V.**, Markina Zh., Orlova T., Waissi G., Kholodov A., Tsatsakis A., Golokhvast K. Dependence of welding fume particle toxicity on electrode type and current intensity assessed by microalgae growth inhibition test // Environmental Research, 2019. Vol. 179, Part B. 108818.
32. 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.
33. Pikula K., **Chaika V.**, Zakharenko A., Markina Z., Vedyagin A., Kuznetsov V., Gusev A., Park S., Golokhvast K. Comparison of the Level and Mechanisms of Toxicity of Carbon Nanotubes, Carbon Nanofibers, and Silicon Nanotubes in Bioassay with Four Marine Microalgae // Nanomaterials, 2020. Vol. 10. 485.
34. **Chaika V.V.**, Vshivkova T.S., Zakharenko A.M., Pikula K.S., Reva G.V., Drozdov K.A., Tsatsakis A.M., Golokhvast K.S. Impact of carbon nanotubes to freshwater invertebrate families Gammaridae, Ephemerellidae и Chironomidae // Toxicology Reports, 2020. Vol. 7. P. 947–954.
35. Pikula K.S., Zakharenko A.M., **Chaika V.V.**, Em Yu.M., Nikitina A.V., Avtomonov E.G., Tregubenko A., Agoshkov A.I., Mishakov I.V., Kuznetsov V.L., Gusev A.A., Park S., Golokhvast K.S. Toxicity of Carbon, Silicon, and Metal-Based Nanoparticles to Sea Urchin *Strongylocentrotus Intermedius* // Nanomaterials, 2020. 10. Номер статьи 1825. P 1-11.

### Патенты

**Патент на полезную модель № 76566.** Голохваст К.С., Гульков А.Н., Паничев А.М., **Чайка В.В.**, Борисов С.Ю. Установка для изучения внешних воздействий на животное. Опубликовано 27.09.2008. Бюл. №27.

**Патент №2682673.** Пикула К.С., Захаренко А.М., Голохваст К.С., **Чайка В.В.**, Чернышев В.В., Угай С.М. Способ оценки токсичности жидкости. Опубликовано 20.03.2019. Бюл. №8.