

На правах рукописи



Гусев Александр Анатольевич

**ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО
УГЛЕРОДА**

Специальность 03.02.08 – Экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Иркутск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина» и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Научный консультант: д.б.н., доцент, директор ИМЕиИТ ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина» **Емельянов Алексей Валерьевич**

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор, декан биолого-химического факультета, заведующий кафедрой биологии растений и биохимии ФГБОУ ВО «Томский государственный педагогический университет» **Минич Александр Сергеевич**

д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» **Соседова Лариса Михайловна**

д.б.н., профессор, профессор кафедры «Общей химии с курсом биоорганической и органической химии» ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» **Чурилов Геннадий Иванович**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева»

Защита диссертации состоится «17» марта 2017 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. проф. М.М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ИГУ» им. В.Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте ИГУ: <http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=83>

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел./факс: (3952) 24-18-55; e-mail: dissovet07@gmail.com

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.б.н., доцент



Приставка А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В результате лесных пожаров, палов, сжигания сельскохозяйственных отходов, использования углеводородного топлива на электростанциях и транспорте в окружающую среду ежегодно поступает до 150 млн. тонн микро- и нанодисперсных продуктов неполного сгорания органических соединений, включая ряд аллотропных модификаций углерода, как аморфных (сажа), так и кристаллических (углеродные нанотрубки (УНТ), фуллерены и др.). Многостенные УНТ (МУНТ), наиболее распространены в природе (Velasco-Santos et al., 2003; Murg, Guerrero, 2006), способны сохраняться и накапливаться в окружающей среде (Murg et al., 2004, 2006; Klaine et al., 2012), проникать и аккумулироваться в живых организмах (Metcalfee et al., 2009; Zhu et al., 2009). Это может иметь негативные последствия для здоровья (Кирпичников, 2009; Lam et al., 2004; Poland et al., 2008; Yang et al., 2009; Jackson et al., 2013): по данным ВОЗ высокодисперсные загрязнения атмосферы являются причиной не менее 7 миллионов преждевременных смертей ежегодно.

Экологические эффекты УНТ к настоящему времени мало изучены (Manchikanti, Vandopadhyay, 2010) в связи с относительно недавним открытием их существования (Iijima, 1991) и сложностью выделения для исследования в чистом виде из природных продуктов (Edgington et al., 2010). Нерешенной проблемой экотоксикологической оценки УНТ является создание алгоритмов их комплексных исследований, выявление ключевых тест-объектов и тест-функций, формирование основ для разработки нормативов по экологической безопасности.

Необходимые для подобных исследований методы и подходы появились с развитием нанотехнологий в последние десятилетия, в связи с чем отмечается экспоненциальный рост числа публикаций, демонстрирующих токсические эффекты наночастиц (НЧ) с характерным размером менее 100 нм (Алексеева, 2007; Donaldson et al., 2004; Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2009; Elsaesser and Howard, 2012). Существенная часть исследований в данной области посвящена изучению свойств УНТ, отличающихся гидрофобностью, химической стойкостью и высокой проникающей способностью (Лысцов, Мурзин, 2007; Годымчук и др., 2012; Фатхутдинова и др., 2013; Саяпина и др., 2014).

Данные по экотоксикологии УНТ разрознены и зачастую противоречивы. Отмечается, что присвоение степени опасности наноматериалов (НМ) по аналогии с уже изученными образцами приводит к искажению результатов (IFCS/Forum-VI/01.TS, 2008). Если для одностенных УНТ (ОУНТ) продемонстрирована возможность биоаккумуляции в тканях высших растений (Khodakovskaya et al., 2009, 2011), то для более массово производимых и образующихся в природе МУНТ этого сделано не было, что затрудняет оценку возможности их биогенной миграции и биоаккумуляции.

В настоящей работе анализировались МУНТ марки «Таунит», промышленно выпускающиеся ООО «НаноТехЦентр» (г. Тамбов). В качестве

тест-объектов использовались представители различных эколого-функциональных групп организмов: сапротрофы (бактерии) *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani and Chalmers 1919, *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887, *E. coli* M-17 (тест-система «Эколюм»); водные авто- и гетеротрофы: фитопланктон (микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, 1835) и зоопланктон (ракообразные *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900, личинки насекомых *Chironomus riparius* Meigen, 1804); наземные автотрофы (высшие растения *Onobrychis arenaria* (Kit) Ser. 1825) и гетеротрофы (млекопитающие *Mus musculus* Linnaeus 1758, гибриды C57B/6×DBA2). Выбор данных тест-объектов был обусловлен следующими критериями: существенная роль в функционировании наземных или водных экосистем, распространенность в практике экотоксикологических исследований, легкость культивирования в лабораторных условиях (Царенко, 1990; Важов, 1997; Методика определения..., 2004; Приказ Росрыболовства..., 2009; Методические рекомендации..., 2009; Postma et al., 1994).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Исследование влияния МУНТ на представителей различных эколого-функциональных групп для формирования методических рекомендаций по установлению пределов толерантности и оценке устойчивости организмов к данному фактору природно-техногенного происхождения в лабораторных условиях.

ЗАДАЧИ РАБОТЫ.

1. Оценить валидность метода концептуального моделирования экологических рисков для определения степени потенциальной опасности МУНТ.

2. Разработать методический комплекс по анализу содержания наночастиц (на примере МУНТ) в природных средах и созданию коллоидных систем на их основе для обеспечения эколого-биологических исследований.

3. Выявить закономерности морфофизиологических реакций организмов различных эколого-функциональных групп на воздействие коллоидных водных растворов МУНТ.

4. Установить возможность проникновения и биоаккумуляции МУНТ в тканях высших растений, оценить возникающие при этом биохимические и морфофизиологические эффекты.

5. Определить характеристики острого и субхронического воздействия МУНТ на млекопитающих.

6. Выявить особенности экологических эффектов кристаллических и аморфных углеродных наноматериалов на примере МУНТ и сажи.

7. Определить параметры экологической безопасности МУНТ, а также выявить тест-объекты и тест-функции для разработки норм воздействия МУНТ на живые организмы.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА, ПРАКТИЧЕСКАЯ И ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Разработана методология экологической оценки МУНТ, включая применение средств объективного контроля их содержания в средах, а также экспериментальная модель поступления МУНТ в биообъекты посредством создания водных суспензий. Впервые методом концептуального моделирования оценен уровень потенциальной опасности МУНТ. Разработана и проведена комплексная оценка эколого-биологических эффектов МУНТ с использованием представителей различных эколого-функциональных групп организмов. Показаны различия в биологических эффектах, связанные с особенностями структуры углеродных материалов на примере сажи (технического углерода по ГОСТ 7885-86) и МУНТ. Обнаружено бактерицидное действие исследуемого углеродного НМ (УНМ) на тест-объектах *E. coli*, *B. cereus* и биосенсоре «Эколюм» (*E. coli* М-17), при этом в ряде случаев отмечен нелинейный дозозависимый эффект воздействия МУНТ. Выявлено, что наиболее устойчивым к изучаемому фактору из исследованных бактерий и гидробионтов являются личинки насекомых *Ch. riparius* и ракообразные *C. affinis*. Установлена безопасная концентрация НЧ в водной среде, составляющая 2 мг/л для микроводоросли *Sc. quadricauda*. На поличенных хромосомах *Ch. riparius* обнаружен выраженный цитогенетический эффект МУНТ. Впервые установлен факт биоаккумуляции МУНТ в тканях растений на примере *O. arenaria*, что расширяет существующие представления о механизмах воздействия НЧ на живые организмы и возможности переноса МУНТ в пищевых цепях. Впервые отмечены гепатотоксический, нефротоксический, пневмотоксический эффекты, а также репродуктивная токсичность МУНТ при субхроническом пероральном введении коллоидного водного раствора лабораторным мышам в среднесуточных дозировках от 0,3 мг/кг и более. Созданы научно-методические основы для определения пределов толерантности биообъектов по отношению к МУНТ и разработки экологически обоснованных норм их содержания в средах.

Теоретическая значимость работы заключается:

- в научном обосновании методологии экологической оценки МУНТ, включающей изучение реакций организмов различных эколого-функциональных групп на молекулярно-клеточном и органно-тканевом уровне с разработкой экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты;

- во внесении теоретического вклада в обоснование патогенетических механизмов воздействия МУНТ на организмы различных эколого-функциональных групп, согласно которым ответная

реакция обусловлена наличием эффектов биоаккумуляции, «малых доз», а также изменением активности ферментных систем и цитогенетического аппарата тест-объектов и тест-функции организмов;

- в перспективном использовании средств объективного контроля содержания МУНТ в средах, а также предложенной экспериментальной модели поступления МУНТ в биообъекты посредством создания водных суспензий для обоснования экологического анализа воздействия на биообъекты различных аллотропных модификаций нанокристаллического углерода.

Большинство предлагаемых методов является экспрессными и доступными широкому кругу исследователей, что обуславливает практическую значимость работы.

Разработаны объекты интеллектуальной собственности: база данных «Биобезопасность наноматериалов» (свид. № 2011620488 от 29.06.2011 г.); ноу-хау «Способ ультразвуковой обработки многокомпонентных смесей» (свид. №2012-0002 от 17.09.2012 г.), «Способ приготовления водных суспензий высокодисперсных материалов с использованием ультразвуковой обработки» (свид. №2013-0002 от 19.06.2013 г.), «Метод мониторинга концентрации аэрозольных частиц» (свид. №93-217-2013 ОИС от 09.12.2013 г.). Результаты исследований использовались в учебном процессе в ТГУ имени Г.Р. Державина по дисциплинам «Биоиндикация окружающей среды», «Расчёты и прогнозирование в экологии», «Экологическая токсикология», «Техногенные системы и экологический риск» у студентов специальности «Экология и природопользование». Разработаны учебно-методический комплекс «Токсикологическое влияние наночастиц на здоровье млекопитающих» и учебное пособие «Безопасность наноматериалов».

Результаты исследований использовались при выполнении финансируемых НИР: «Исследование цитотоксического эффекта многостенных углеродных нанотрубок на тест-объектах различных систематических групп» – № П 208, 2010-2011 (Минобрнауки); «Изучение механизмов физиологических реакций репродуктивной системы животных и растений на воздействия нового ксенобиотика – многостенных углеродных нанотрубок» – № 16.740.11.01-94, 2010-2012 (Минобрнауки); «TEMPUS-RUDECO Профессиональная подготовка для устойчивого развития сельских территорий и экологии» – № 159357-TEMPUS-1-2009-1-DE-TEMPUS-JPHES, 2010-2013 (Европейский Союз); «Анализ правовых норм обеспечения и контроля безопасности производства и продукции наноиндустрии, используемых в международной практике» – № 16.648.11.3001, 2011 (Минобрнауки); «Состояние дисперсной фазы в водных суспензиях нанопорошков для

разработки методик тестирования наноматериалов в физиологических жидкостях» № 07-03/2012, 2012 (III Межвузовский конкурс исследовательских проектов НИУ ТПУ); «Разработка методики экологически чистой молекулярно-клеточной фитоконверсии компонентов шламов металлургической индустрии» № 14.512.12.0002, 2013 (Минобрнауки); «Разработка антибактериальных покрытий на основе углеродных наноматериалов» – №09-25/25МУ-13, 2013 (Управление образования и науки Тамбовской области); №14-08-06824 мол_г_1, 2014 «Научный проект организации и проведения II Всероссийского конкурса научных докладов студентов «Функциональные материалы: разработка, исследование, применение» (РФФИ); №15-34-10118 мол_г_1, 2015 «Проект организации и проведения III Международной молодежной научно-практической конференции «Междисциплинарные проблемы нанотехнологий, биомедицины и нанотоксикологии» (РФФИ); государственное задание на выполнение проекта № 37.901.2014 (Минобрнауки), грант № 8.2.57.2015 (программа «Научный фонд им. Д.И. Менделеева Томского государственного университета», 2016); грант № K2-2016-033 (Минобрнауки, программа повышения конкурентноспособности НИТУ «МИСиС»); №16-38-10174 мол_г, 2016 «Проект организации конкурса научных докладов молодых ученых «Функциональные наноматериалы в биомедицине» в рамках IV Международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы»» (РФФИ) и ряда других.

Практическое применение результатов исследований выразилось в разработке внедренных в производство рекомендаций, исключающих попадание МУНТ на слизистые оболочки персонала, задействованного при исследовании, производстве, хранении, транспортировке и утилизации УНМ (Акт о внедрении от 21.04.2014).

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные положения работы доложены и представлены на 12-15-ой школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008-2011 гг.); Всероссийской конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009); Всероссийской конференции «Проведение научных исследований в области наносистем и наноматериалов» (Белгород, 2009); 2-6-ом Международных форумах по нанотехнологиям (Москва, 2009-2013 гг.); 1-ой и 2-ой Международных школах «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» (Ступино, 2009, 2011); Asian Congress on Biotechnology (Шанхай, 2011), 4-ом Международном Казанском инновационном нанотехнологическом форуме NANOTECH'2012 (Казань, 2012); 4-ом Международном конгрессе «Nanotechnology, Medicine & Biology «BioNanoMed 2013» (Кермс, 2013); 2-ой Международной конференции QNano «Quality in

nanosafety assessment – driving best practice and Innovation» (Прага, 2013); Russian-German Nanotechnology Forum (Томск, 2013); 2-ой Международной школе-конференции «Applied NanoTechnology and NanoToxicology» (Листвянка, 2013); 6-ом Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых учёных-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); Международном конгрессе «NanoTox-2014» (Анталья, 2014); 1-3 Международных научно-практических конференциях «Междисциплинарные проблемы нанотехнологий биомедицины и нанотоксикологии» (Тамбов, 2013-2015); 4-ой Международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы NLS-2016» (Москва, 2016) и других мероприятиях.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЙ. По теме диссертации опубликовано 49 статей, в том числе 30 – в рекомендованных ВАК рецензируемых изданиях, а также 2 учебно-методических пособия.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА РАБОТЫ. Диссертация состоит из введения, 8 глав, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 293 источника, в том числе 174 на иностранных языках. Диссертация изложена на 239 страницах, содержит 18 таблиц и 62 рисунка.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. МУНТ являются экологическим фактором природно-техногенного происхождения, обладающим ранее не описанными эколого-токсикологическими характеристиками.

2. Применение методов экологического контроля по отношению к МУНТ должно дополняться изучением реакций организмов различных эколого-функциональных групп на молекулярно-клеточном и органно-тканевом уровне вследствие установленного наличия эффектов биоаккумуляции, «малых доз», а также изменения активности ферментных систем и цитогенетического аппарата тест-объектов под воздействием МУНТ.

3. Использование концептуального экологического моделирования позволяет выявить потенциальные угрозы со стороны наноструктурных поллютантов при первичной оценке экологической безопасности МУНТ.

4. Рекомендуются следующие ориентировочными пороговые значения: концентрация МУНТ в водной среде не должна превышать 2 мг/л, среднесуточная дозировка при пероральном поступлении млекопитающим – не более 0,3 мг/кг.

5. На примере МУНТ показано, что использованные научно-методические подходы применимы для экологического анализа воздействия на биообъекты различных аллотропных модификаций нанокристаллического углерода, таких как ОУНТ, фуллерены, графены.

БЛАГОДАРНОСТИ. Данная работа не была бы возможна без помощи следующих коллег: сотрудников ТГУ имени Г.Р. Державина (г. Тамбов) – д.ф.-м.н. Ю.И. Головина, к.б.н. С.В. Шутовой, к.х.н. О.А. Шеиной, О.Н. Зайцевой, И.А. Васюковой, О.В. Захаровой и О.А. Селивановой; д.т.н. А.Г. Ткачева из ТГТУ (г. Тамбов); сотрудников МГУ имени М.В. Ломоносова (г. Москва) – д.б.н. А.В. Феофанова, д.б.н. Е.А. Смирновой, д.б.н. Г.Е. Онищенко, к.б.н. Е.М. Лазаревой; д.м.н. Л.М. Фатхутдиновой и к.м.н. Т.О. Халиуллина из КГМУ (г. Казань); к.б.н. Е.В. Кузнецовой из Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск), к.б.н. И.А. Федоровой из НИУ СГУ имени Н.Г. Чернышевского (г. Саратов); д.б.н. Э.А. Снегина из НИУ БелГУ (г. Белгород); к.т.н. Д.В. Кузнецова из НИТУ «МИСиС» (г. Москва), к.т.н. А.Ю. Годымчук из НИУ ТПУ и к.б.н. Ю.Н. Моргалева из НИ ТГУ (г. Томск); А.Ю. Убогова из ГБУЗ «Тамбовское областное патологоанатомическое бюро» (г. Тамбов); Н.Е. Пиляшенко из филиала ФГУ «Центр лабораторного анализа и технических измерений» (г. Тамбов). Всем им автор выражает сердечную признательность.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ, МЕТОДИЧЕСКОЙ И НОРМАТИВНО-ПРАВОВОЙ БАЗЫ В ОБЛАСТИ БЕЗОПАСНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В главе приводится обзор научных публикаций, включая зарубежные источники. Проводится критический анализ имеющихся методик и результатов оценки токсичности различных НМ включая УНМ. Отмечается дефицит научных знаний об экологическом воздействии наноразмерных частиц на фоне активного развития нормативно-методической базы для оценки безопасности НМ. Анализируются данные, свидетельствующие о повышенной токсичности НМ по сравнению с химическими аналогами. Рассматриваются различные концепции, объясняющие механизмы токсического действия наноструктурных материалов на биологические объекты.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объем анализируемого в работе материала представлен в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика материала, использованного в работе

Раздел работы	Характер материала	Количество (объем) материала
Глава 1, Глава 3	Научные статьи, обзоры, мета-исследования, методические документы	Более 250 источников
Глава 2	Пробы атмосферного воздуха, образцы МУНТ из разных партий	30 проб; 8 образцов
Глава 4	Культура бактерий <i>E. coli</i>	54 пробирки с 1 см ³ культуры
	Культура бактерий <i>B. cereus</i>	54 пробирки с 1 см ³ культуры
	Биосенсор «Эколюм» <i>E. coli</i> M-17	108 кювет с 0,1 см ³ культуры
	Одноклеточные зеленые водоросли <i>Sc. quadricauda</i>	1800 полей зрения на 180 препаратах клеток
	Цериодафнии <i>C. affinis</i>	180 пробирок с рачками
Глава 5	Личинки комаров <i>Ch. riparius</i>	240 личинок (2400 клеток)
	Проростки эспарцета песчаного <i>O. arenaria</i>	3000 растений, 200 гистологических препаратов
Глава 6	Самцы и самки мышей C57B/6×DBA2	511 животных, 1750 гистологических препаратов, 70 проб плазмы крови

2.1 Характеристика исследуемого материала

В работе исследовались образцы МУНТ марки «Таунит», содержание аморфной фазы (по данным рентгеновской дифракции) составляло не более 2 %. С помощью методов просвечивающей (ПЭМ) и сканирующей (СЭМ) электронной микроскопии установлено, что диаметр нанотрубок составляет $11 \div 28$ нм, длина – $5 \div 10$ мкм; расстояние между слоями атомов углерода в нанотрубках ~ 0,25 нм. УНМ представляют собой агломераты размером от 1...1000 мкм со структурой спутанных пучков многостенных углеродных нанотрубок (рис. 1). Данный материал синтезируется методом газофазного химического осаждения (ГФХО или CVD-процесс) путём каталитического пиролиза углеводородов. Его промышленное производство освоено ООО «НаноТехЦентр» в г. Тамбове.

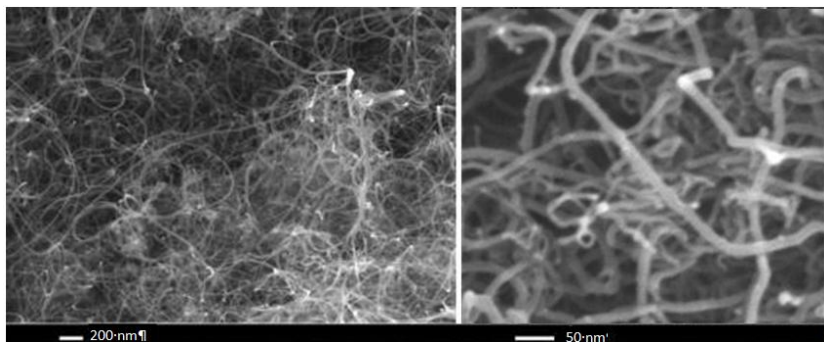


Рис. 1. Морфология исследуемого углеродного НМ (СЭМ)

Исследуемый материал является перспективным для использования в медицине, фармацевтике, создании фильтров широкого назначения, а также производстве целого ряда конструкционных и функциональных материалов (Мищенко, Ткачев, 2007).

2.2 Методики исследований

Исследования исходных МУНТ проводили с помощью ПЭМ с исследованием дифракции электронов, использовались просвечивающие электронные микроскопы JEM-1011 (JEOL, Япония) и LEO 912AB (Carl Zeiss, Германия), а также методом СЭМ с рентгенофлуоресцентным анализом с помощью сканирующих электронных микроскопов Neon 40 и Merlin (Carl Zeiss, Германия).

Экспериментальные исследования концентрации НЧ в атмосферном воздухе проводились с помощью спектрометра-классификатора частиц с высокой мобильностью FMPS модель 3091 (TSI, США).

Выбор способов диспергирования НМ в воде, оптимального режима, обеспечивающего получение стабильных коллоидных растворов, последующего контроля их качества осуществлялись в соответствии с разработанными в ходе исследования ноу-хау. МУНТ и сажу диспергировали в дистиллированной воде при помощи ультразвуковой обработки в течение 5 минут, мощность – 300 Вт, частота – 23,740 кГц. Дистиллированную воду для контрольных экспериментов обрабатывали аналогичным образом. Размер и ζ -потенциал частиц в суспензиях анализировали с помощью прибора Zetasizer Nano (Malvern, Великобритания). В экспериментах использовались коллоидные растворы в концентрациях 1 мг/л – 10 г/л.

Моделирование уровня потенциальной опасности НМ проводилось путем создания генеральных определительных таблиц. В результате анализа функциональных блоков модели определялись итоговая оценка опасности D и мера неопределенности U (Методические рекомендации..., 2009).

Для оценки воздействия МУНТ на выживаемость бактерий *E. coli* и *B. cereus* использовали музейные культуры, взвешенные в дистиллированной воде в концентрации $3 \cdot 10^8$ КОЕ/см³, смешанные в равных объемах с исследуемыми суспензиями НМ в 5 пробирках в трёхкратной повторности. Высев на питательный агар производили методом штриховой разводки из каждой пробирки, инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Число клеток бактерий определяли с помощью стандартной таблицы (Isenberg et al., 1985).

Эффекты МУНТ по интенсивности гашения биолюминесценции бактерий *E. coli* М-17 (тест-система «Эколюм») устанавливали с помощью определения эффективных концентраций (полулетальной ЕС₅₀ и безвредной ЕС₂₀) с помощью прибора «Биотокс-10» (ООО «НЕРА-С», Россия).

Оценка экотоксичности МУНТ по выживаемости цериодафний *C. affinis* осуществлялась в ходе 48 часовой экспозиции. Расчет полулетальных (ЛК₅₀₋₄₈) и безвредных (БК₁₀₋₄₈) концентраций вели с использованием пробит-анализа (Коросов, Калинин, 2003).

Выживаемость микроскопических зеленых водорослей *Sc. quadricauda*, в присутствии МУНТ оценивались в ходе 72-часовой экспозиции. Значения ингибирующей и безвредной кратностей разбавления (ИКР₅₀₋₇₂ и БКР₂₀₋₇₂) рассчитывали с помощью пробит-анализа.

Анализ цитогенетических эффектов МУНТ был основан на исследовании политенных хромосом личинок хирономид *Ch. riparius* (Дёмин, 1989; Stockert, 1990) методом световой микроскопии с помощью программы Autodesk. Экспозиция составляла 24 ч., 48 ч., 72 ч. и 96 ч. Полулетальную концентрацию ЛК₅₀ и безвредную концентрацию БК₂₀ определяли методом пробит-анализа.

Оценка воздействия МУНТ на высшие растения проводилась с использованием семян эспарцета сорта Розовый 89 (*O. arenaria*): определялись всхожесть семян (%), энергия прорастания (%), линейные размеры надземных и подземных частей растений в течение 10 дней в средах, содержащих коллоидный водный раствор МУНТ. Для приготовления контрольных сред использовались дистиллированная вода, а также коллоидные водные растворы технического углерода (сажи). В каждом опыте оценивалось по 200 семян. Условия проращивания соответствовали требованиям методики ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести».

Определение активности растворимых пероксидаз, каталазы и полифенолоксидазы, а также и содержания хлорофиллов и каротиноидов в присутствии МУНТ осуществлялось фотометрически (Бояркин, 1951; Ермаков и др., 1987; Паду, 1995; Сибгатуллина и др., 2011; Аебу, 1984) при помощи спектрофотометра СФ-2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия). Активность фитогормонов определялась методами высокоэффективной

жидкостной хроматографии (Biotronic, Германия) и по росту гипокотилей салата «Берлинский» (Скоробогатова, 1999).

Поиск и идентификацию МУНТ в тканях проростков проводили с помощью световой (микроскоп Leica DM1000 с цифровой камерой Leica DFC (Leica, Германия)) и просвечивающей (микроскопы JEM-1011 (JEOL, Япония) и LEO 912AB (Carl Zeiss, Германия)) электронной микроскопии с исследованием дифракции электронов.

Для исследования оценки острых и субхронических эффектов МУНТ осуществлялись морфофизиологические исследования *in vivo* на лабораторных мышцах-гибридах C57B/6×DBA2.

Все работы с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации и отвечали принципам надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434-2009) с учетом норм биоэтики. Для исследования острой токсичности были сформированы 3 группы животных (контроль, «сажа», и МУНТ) по 7 половозрелых самцов массой 18-20 г. в каждой. Перед экспозицией животные содержались в условиях карантина в течение 10 дней. Исследуемые материалы вводились однократно внутривентрикулярно в дозе 5000 мг/кг, контроль – дистиллированная вода. Эксперимент продолжался в течении двух недель, затем животные подвергались эвтаназии (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013) и вскрывались для гистологических исследований (Hedrich, 2012), проводимых с помощью процессора Tissue-Tek («Sakura», Япония) и методов световой микроскопии (Ромейс, 1953). Оценивался уровень летальности, а также общее состояние животных и наличие морфофизиологических нарушений.

Для анализа подострой (субхронической) токсичности были сформированы 4 экспериментальные (МУНТ – 0,3 мг/кг; 3 мг/кг; 30 мг/кг; сажа – 30 мг/кг) и 1 контрольная (dH₂O) группы животных, включавшие по 14 половозрелых мышей-самцов массой 18-20 г. МУНТ и сажа поступали перорально путем замены питьевой воды на соответствующий коллоидный раствор. По истечении срока экспозиции 7 самцов из каждой исследованной группы подвергались эвтаназии и вскрывались для гистологических исследований. К оставшимся самцам подсаживалось по 3 виргинных неэкспонированных самки. Подсаживание производилось четыре раза с периодичностью один раз в семь дней. После 4-ой подсадки самцы подвергались эвтаназии и вскрывались. Для оценки воздействия МУНТ на репродуктивную систему был проведен цитогистологический анализ семенников с расчетом индекса сперматогенеза (Саноцкий, 1970; Юнда, 1990). Для определения уровня стрессированности экспериментальных животных анализировались показатели уровня кортикостерона в плазме крови. Для выявления изменений гормонального фона исследовалось содержание свободного тестостерона, лютеинизирующего (ЛГ) и

фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов в плазме крови. Анализы проводили иммуноферментным методом. Отсаженных самок подвергали эвтаназии спустя 15 дней после подсадки к самцам и вскрывали для оценки индекса оплодотворяющей способности I (Курляндский, Филов, 2002; МР №98/304, 1998). Поиск мест локализации МУНТ в тканях осуществлялся с помощью ПЭМ, с учетом рекомендаций Роспотребнадзора (Определение приоритетных..., 2010).

Для обработки данных использовались непараметрические методы статистического анализа при 5%-ом уровне значимости с использованием U-критерия Манна-Уитни и критерия знаков (Гланц, 1998; Васильева, 2007). Для анализа данных и обработки изображений использовались пакеты программ Statistica 10, Autodesk и Microsoft Office 2007.

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ В СРЕДАХ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПЕРЕХОДА МУНТ В БИОДОСТУПНУЮ ФОРМУ

Методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии исследуемый материал был идентифицирован как МУНТ, кроме того, были описаны его важнейшие структурные характеристики (раздел 2.1).

Спектрометрический экспресс-анализ содержания НЧ в атмосфере показал способность перехода МУНТ в аэрозольное состояние в ходе их синтеза. В производственной зоне (цех углеродных НМ) отмечена фракция более мелких частиц (max. распределения 77,5 нм в диапазоне от 10,8 нм до 339,8 нм) по сравнению с контролем (max. распределения 80 нм в диапазоне от 14,3 нм до 339,8 нм) (рис. 2). Показатель концентрации НЧ в воздухе производственной зоны ($2,41 \cdot 10^4$ шт./см³) превысил контрольное значение ($8,80 \cdot 10^3$ шт./см³) в 2,74 раза. Это указывает на наличие угрозы загрязнения окружающей среды МУНТ, что согласуется с результатом работы Т.О. Халиуллина (2013).

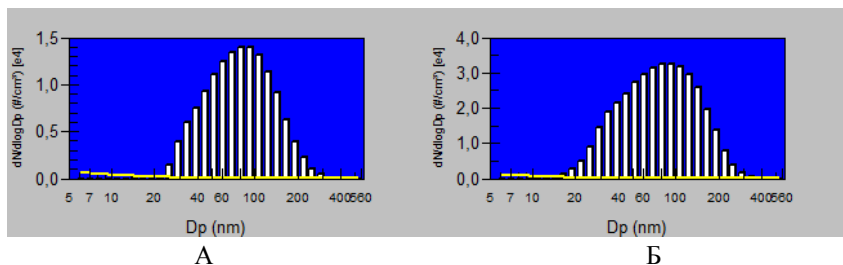


Рис. 2. Распределение аэрозольных НЧ по размерам и концентрации контроль (А) – непромышленная зона и эксперимент (Б) – производственная зона

При создании водных суспензий МУНТ было решено отказаться от использования стабилизаторов, способных существенно повлиять на результаты биологических экспериментов (Dayeh et al., 2004; Godymchuk et al., 2015). Использовался подход, включающий ультразвуковую обработку, а также контроль качества коллоидных систем методом динамического светорассеяния с оценкой размера и ζ -потенциала НЧ. На рис. 3 представлены результаты исследования полученных суспензий МУНТ.

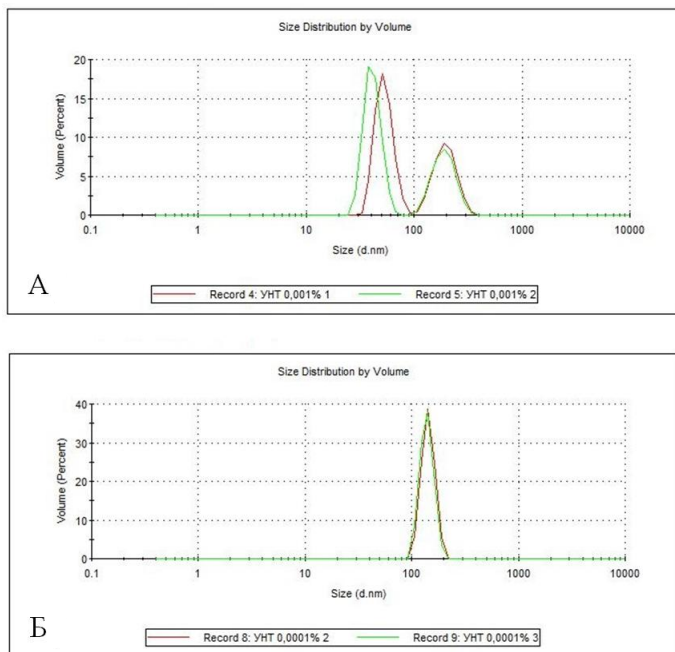


Рис. 3. Распределение частиц по размерам и концентрации в водных суспензиях МУНТ после ультразвуковой обработки. Концентрация МУНТ: А) 1 г/л, Б) 0,1 г/л

Максимумы распределения диспергированных частиц лежат в субмикронном и нанометровом диапазонах. Данный способ создания модельных сред был также успешно апробирован для НЧ Al, Cu, CuO, SiO₂, TiO₂, ZnO, композитов на основе МУНТ и др., что подтверждает его применимость в ходе проведения эколого-биологических исследований при условии использования свежеприготовленных суспензий.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ МУНТ МЕТОДОМ КОНЦЕПТУАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Важным этапом оценки безопасности НМ является моделирование их воздействия на биообъекты (Гмошинский и др., 2010). С целью получения предварительного заключения о степени потенциальной опасности МУНТ применена методика, рекомендованная Роспотребнадзором РФ (Методические рекомендации..., 2009).

В используемой модели учитывалось 25 признаков в шести функциональных блоках, отражающих важнейшие характеристики НМ. Расчёт «частной» опасности по функциональным блокам производился по формуле:

$$D_k = \frac{\sum_{i=1}^N R_i \varphi_i}{\sum_{i=1}^N R_i^{\max} \varphi_i}$$

где k – порядковый номер функционального блока, D_k – его «частная» опасность, i – порядковый номер признака, N – общее число признаков в функциональном блоке, R_i – оценка выраженности признака в баллах, R_i^{\max} – максимально возможная балльная оценка данного признака ($R_i^{\max} = 4$) φ_i – значение взвешивающей функции для i -го признака.

Итоговая оценка опасности рассчитывалась по формуле:

$$D = \sqrt{\sum_{k=1}^6 D_k^2}$$

В табл. 2 представлены значения показателя опасности D .

Таблица 2

Значения показателя опасности D

№ п/п	Значение D	Степень потенциальной опасности
1	0,441-1,110	Низкая
2	1,111-1,779	Средняя
3	1,780-2,449	Высокая

Мера неопределенности, характеризующая неполноту оценки получаемого результата, рассчитывалась по формуле:

$$U = \frac{\sum_{i=1}^{25} u_i \varphi_i}{\sum_{i=1}^{25} \varphi_i}$$

где u_i принимает значение «1», если i -тый признак признаётся неопределенным и «0» – при любой другой его оценке; φ_i – величина «взвешивающей функции» для данного признака. Характеристика неполноты оценки опасности проводилась в соответствии с табл. 3.

Таблица 3
Значения коэффициента неполноты оценки опасности НМ U

№№ п/п	Значение U	Характеристика
1	0 - 0,250	Оценка достоверна
2	0,251-0,750	Оценка сомнительна
3	0,751-1,000	Оценка недостоверна

Результаты моделирования представлены в табл. 4. Установлено, что исследуемый материал имеет высокий уровень потенциальной опасности (см. табл. 2).

Таблица 4
Оценка степени потенциальной опасности МУНТ

Функциональный блок модели	1. Геометрические характеристики	2. Физико-химические свойства	3. Молекулярно-биологические свойства	4. Цитологические свойства	5. Физиологические свойства	6. Экологическая характеристика
Значение коэффициента частной опасности D_i	1,000	0,908	0,925	0,783	0,724	0,739
Суммарное значение опасности НМ D	2,270 (высокий уровень потенциальной опасности)					

Полученное значение коэффициента неполноты $U=0,162$, учитывавшего неопределенность ответов в блоках 2-6, указывает на достоверность проведенной оценки (см. табл. 3). Таким образом, результаты моделирования указывают на необходимость проведения полного комплекса исследований безопасности изучаемого материала (Методические рекомендации..., 2009).

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МУНТ НА БАКТЕРИЙ И ГИДРОБИОНТОВ

Воздействие МУНТ на эффективность процессов биодеструкции и функционирования водных экосистем исследовалось путем биотестирования НМ с использованием распространенных в экотоксикологии экспресс-методик и объектов, представляющих различные эколого-функциональные группы, – бактерии, микроводоросли, ракообразные и членистоногие.

Класс опасности МУНТ определялся кратностью разведения водной вытяжки, при которой не выявлено воздействие на тест-объекты в соответствии с установленными критериями (табл. 5).

Таблица 5

Критерии отнесения к классам опасности (Приказ Министерства..., 2001)

Класс опасности	Кратность разведения водного раствора
I (чрезвычайно опасные)	> 10000
II (высокоопасные)	от 10000 до 1001
III (умеренно опасные)	от 1000 до 101
IV (малоопасные)	< 100
V (практически не опасные)	1

Негативный эффект по отношению к бактериям *E. coli* и *B. cereus* начинал проявляться уже в концентрации 1 мг/л, в дальнейшем следовало нелинейное изменение токсичности МУНТ, достигавшее максимума при концентрации 1 г/л (табл. 6). Результаты экспериментов с исследованными видами бактерий согласуются с данными о антимикробной активности углеродных НЧ (Kang, 2008; Dong et al., 2012). Неравномерная динамика изменения экотоксикологических свойств, описанная и для других НМ (Iavicoli et al., 2010; Nascarella, Calabrese, 2012; Stovbun et al., 2012), не позволила определить полулетальные и безопасные концентрации для *E. coli* и *B. cereus*.

Таблица 6

Воздействие МУНТ на тест-объекты *E.coli* и *B. cereus*

Число клеток бактерий / 1 см ³	Концентрация МУНТ, мг/л					
	0 (контроль)	1	10	100	1000	10000
<i>E.coli</i>	1×10 ⁷	1×10 ⁶	1×10 ⁵	5×10 ⁴	5×10 ⁴	1×10 ⁵
<i>B. cereus</i>	5×10 ⁵	1×10 ⁵	5×10 ⁵	1×10 ⁵	5×10 ⁴	1×10 ⁵

В то же время на тест-системе «Эколом» (*E. coli* М-17), объектах *C. affinis*, *Sc. quadricauda* и *Ch. riparius* получены линейные зависимости «доза-эффект» (табл. 7). Отмеченные различия в реакции бактерий *E. coli* и *E. coli* М-17 на воздействие МУНТ могут быть связаны с особенностями последнего тест-объекта, представляющего собой геномодифицированную культуру бактерий, а также с различным периодом экспозиции (соответственно, 24 ч и 0,5 ч), поскольку с течением времени НЧ в коллоидных системах коагулируют и меняют активность (Dayeh et al., 2004; Godymchuk et al., 2015).

Таблица 7

Воздействие МУНТ на тест-объекты «Эколом», *C. affinis*, *Sc. quadricauda* и *Ch. riparius*

Тест-объект	Концентрация коллоидного раствора МУНТ (мг/л)					Класс опасности
	100	10	1	0,1	0,01	
«Эколом» (<i>E. coli</i> М-17)	0	0	0	1	1	III
<i>C. affinis</i>	0	0	1	1	1	IV
<i>Sc. quadricauda</i>	0	0	0	1	1	III
<i>Ch. riparius</i>	0	1	1	1	1	IV

Примечание: 0 – организмы не выжили, 1 – организмы выжили

Установлено, что исследуемые МУНТ относятся к умеренно опасным веществам (см. табл. 3), что соответствует классу опасности такого УНМ, как сажа (<http://www.fkko.ru>). Относительно невысокая токсичность МУНТ в острых экспериментах согласуется с результатами других исследований (Kang, 2008; 2009). Механизмами действия НМ могут служить повреждение мембран клеток, окислительный стресс (Vecitis, 2010) или механическое воздействие агломератов НЧ на органы дыхания личинок насекомых и цериодафний (Колесникова и др., 2011).

Расчеты полулетальных и безвредных концентраций показали, что наименее чувствительными к действию НМ являются личинки *Ch. riparius* и цериодафнии, максимальная рефлексия установлена для бактерий и водорослей (табл. 8). Наибольший токсический эффект отмечен для бактерий *E. coli* М-17. Наименьшее пороговое значение установлено для микроводорослей *Sc. quadricauda* и составляет 2 мг/л. Следовательно,

безопасные для гидробионтов и бактерий концентрации МУНТ не превышают данного значения.

Таблица 8

Значения полулетальных и безвредных концентраций МУНТ

Тест-объект	Полулетальная концентрация МУНТ, мг/л	Безвредная концентрация МУНТ, мг/л
<i>C. affinis</i>	500	100
<i>Sc. quadricauda</i>	215	2
«Эколюм»	130	74
<i>Ch. riparius</i>	86000	52000

Следует отметить, что установленный класс опасности НМ (см. табл. 7) характеризуется как «умеренно-опасный» (Приказ..., 2001). Таким образом, экспериментальные данные не подтверждают результаты концептуального моделирования (глава 4). Однако итоги цитогенетических исследований указывают на возможные отдаленные эффекты, связанные с нарушениями морфологии хромосом (рис. 4).



Рис. 4. Микрофотография ядрышкового организатора (ЯО) политенных хромосом клеток слюнных желез личинок *Ch. riparius* А) контроль, Б) 24 ч. экспозиция МУНТ (концентрация 50 г/л)

Отмечено увеличение (на 15,61-47,26%) активности ядрышкового организатора политенных хромосом клеток личинок хирономид под действием МУНТ. Это свидетельствует о включении краткосрочных механизмов клеточной гиперкомпенсации для восстановления гомеостаза соматических клеток (Зацепина, 2007). Реакция *Ch. riparius* на субклеточном уровне является более чувствительной по сравнению с реакцией на организменном уровне. По результатам теста на выживаемость данный тест-объект оказался наиболее резистентным к действию МУНТ (см. табл. 8).

В целом, за исключением показавших нелинейные концентрационные эффекты тестов на бактериях *E.coli* и *B. cereus* и теста на выживаемость *Ch.*

riparius, проявившего низкую чувствительность, использованные в разделе методы применимы для проведения экологической экспресс-оценки УНМ.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ МУНТ К БИОАККУМУЛЯЦИИ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ И СОПУТСТВУЮЩИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Высшие растения и млекопитающие – наиболее вероятные объекты воздействия МУНТ, образующихся из природных и техногенных источников. Поэтому изучение процессов бионакопления и влияния НЧ на биохимическом и клеточно-тканевом уровне – важная задача для понимания роли высокодисперсных продуктов неполного сгорания соединений углерода в функционировании наземных экосистем. При проращивании эспарцета в присутствии МУНТ корни, стебли и листья проростков приобретали характерный темно-серый цвет. Анализ тотальных препаратов проростков с помощью световой микроскопии показал, что конгломераты темно-серого и черного цвета локализируются как на поверхности корней проростков, так и во внутренних зонах корней, стеблей и листьев, присутствуют в клетках и межклеточном пространстве. Применение ПЭМ установило, что в вариантах 100 и 1000 мг/л имело место массовое образование конгломератов из МУНТ и, вероятно, графитизированного углерода в тканях корня (рис. 5А) и листа (рис. 5Б). Это согласуется с фактом проникновения и биоаккумуляции УНМ других типов в различных частях растений риса, продемонстрированным в работе Лин (Lin, 2009). Накопление МУНТ, проникающих сквозь клеточную стенку клеток эпидермиса и корневых волосков на глубину до 4 мкм, отмечено в проростках пшеницы (Khodakovskaya, 2009; Ma, 2010).

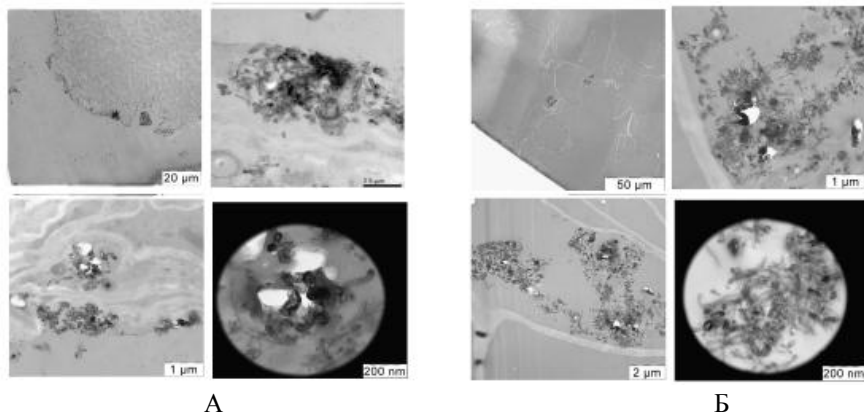
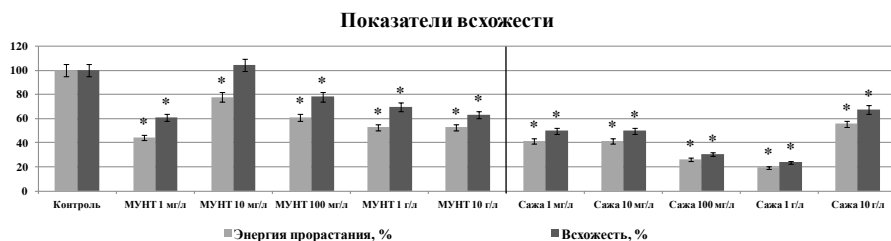


Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов эспарцета при различном увеличении (А – корень, Б – лист)

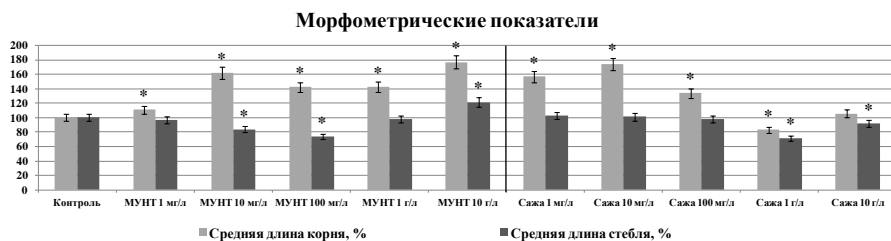
Наблюдаемое нами внедрение МУНТ в цитоплазму опровергает мнение о неспособности МУНТ к проникновению в клетки, что связывают с большим диаметром МУНТ по сравнению с ОУНТ (Wild, 2010). Последние не только нарушают целостность клеточной стенки, но и обнаруживаются внутри клеток (Liu, 2009). В ходе настоящего исследования отмечена высокая концентрация МУНТ в районе устьиц, что свидетельствует о важной роли процесса транспирации в бионакоплении НЧ. Способность МУНТ к проникновению и биоаккумуляции в растениях указывает на высокую потенциальную опасность и подтверждает результаты проведенного моделирования (глава 4).

Отмечено подавление НМ процессов прорастания семян *O. arenaria* на 21,74-39,13% (рис. 6А), разнонаправленное влияние на рост стеблей (от -26,4 до +21,5%) и позитивное (до +76,7%) на рост корней (рис. 6Б). Усиление роста корней эспарцета возможно объясняется выдвинутой в работе М. Ходаковской (Khodakovskaya, 2009) гипотезой об увеличении поступления воды вследствие «пронзания» кожицы семян УНТ.

Действие МУНТ на растения не линейно связано с концентрацией и отличается от действия углерода другой аллотропной модификации (сажи) (см. рис. 6).



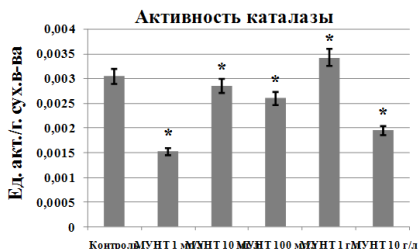
А



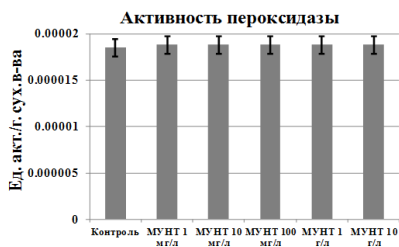
Б

Рис. 6. Влияние МУНТ на показатели А) всхожести и Б) развития проростков *O. arenaria* (здесь и далее в разделе знаком * обозначены варианты, в которых отмечено достоверное различие с контрольными значениями при $p < 0,05$)

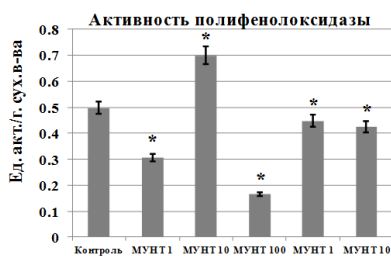
Анализ влияния МУНТ на антиоксидантную систему проростков эспарцета показал снижение активности каталазы при всех концентрациях НМ, за исключением группы «МУНТ 1 г/л», где отмечалось увеличение исследуемого показателя (рис. 7А). Наименьшая активность фермента (в 1,5 – 2 раза ниже контрольного значения) наблюдалась при минимальной и максимальной концентрации МУНТ. Показатели активности пероксидазы в проростках эспарцета под действием МУНТ достоверно не отличались от контрольных значений (рис. 7Б). Исследование влияния МУНТ на активность полифенолоксидазы продемонстрировало ее снижение, за исключением группы «МУНТ 10 мг/л», где зафиксировано максимальное значение, превышающее контрольное в 1,5 раза (рис. 7В). Отмеченные изменения активности ферментов антиоксидантной системы согласуются с результатами работы Н.И. Косолаповой и др. (2010) и, вероятно, свидетельствует о возникновении под действием НЧ окислительного стресса, который рассматривается в качестве возможного механизма их токсичности (Begum et al., 2012).



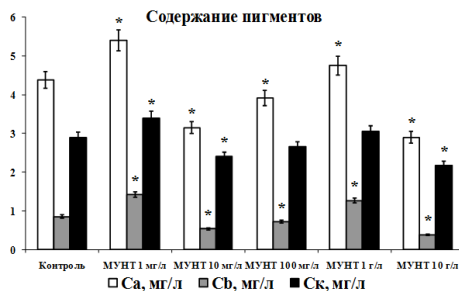
А



Б



В



Г

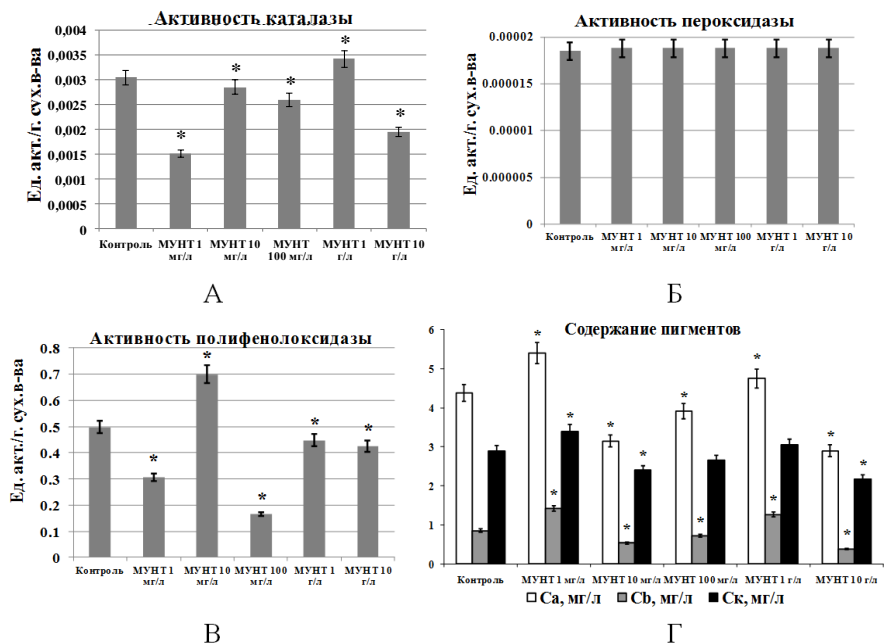


Рис. 7. Влияние МУНТ на активность ферментов антиоксидантной системы: А) каталазы; Б) пероксидазы; В) полифенолоксидазы; Г) на содержание пигментов в проростках *O. arenaria*

Минимальные значения содержания хлорофиллов a,b и каротиноидов зафиксированы в группах «МУНТ 10 мг/л» и «МУНТ 10 г/л», максимальное – в группе «МУНТ 1 мг/л» (рис. 7 Г). Стоит отметить, что в этой же группе ранее было отмечено снижение активности ферментов антиоксидантной системы. В остальных случаях МУНТ оказывают ингибирующее действие на фотосинтетическую систему эспарцета, что соответствует отмеченным изменениям показателей всхожести и активности антиоксидантных ферментов.

Установлено, что наличие МУНТ в среде прорастания семян оказывает значительный эффект на концентрацию фитогормонов в проростках *O. arenaria*. С увеличением концентрации МУНТ в тестируемой среде, увеличивается концентрация индолилуксусной кислоты (рис. 8А). При этом концентрация цитокининов, напротив, уменьшается (рис. 8Б).

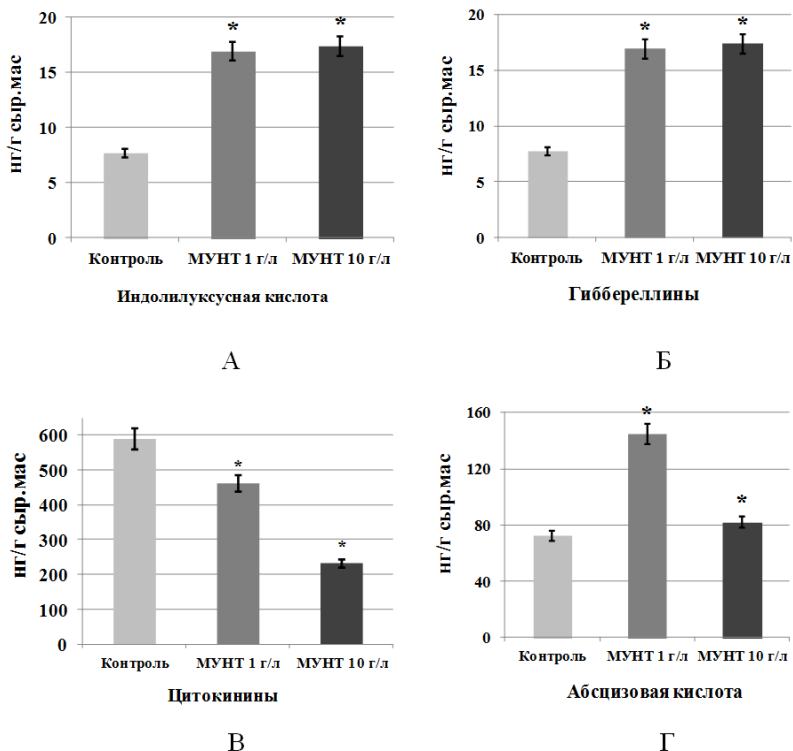


Рис. 8. Влияние МУНТ на концентрацию фитогормонов 10-дневных проростков эспарцета песчаного (*O. arenaria*). А) Концентрация индолилуксусной кислоты. Б) Концентрация цитокининов. В) Концентрация гибберелинов. Г) Концентрация абсцизовой кислоты

Максимальная концентрация гиббереллинов (177,79 нг/г сыр массы) отмечена при 1 г/л МУНТ, а при 10 г/л она на 48% меньше, чем в контрольном образце (рис. 8В). Концентрация абсцизовой кислоты в группе «МУНТ 1000 мг/л» в 2 раза превышает контроль; при увеличении содержания МУНТ данный показатель снижается до 113% от контрольного значения (рис. 8Г). Рост концентрации «стрессового» гормона растений – абсцизовой кислоты свидетельствует об угнетающем действии НМ. Механизм воздействия МУНТ на клетки растений может объясняться изменением восприимчивости рецепторов фитогормонов, описанным для других типов НЧ (Binder et al., 2007; Strader et al., 2009).

Несмотря на отсутствие выраженных дозозависимых эффектов, наличие достоверных изменений энергии прорастания, всхожести, морфометрических характеристик, активности ферментов антиоксидантной системы и фитогормонов, а также содержания растительных пигментов, начиная с

самых низких концентраций МУНТ, делает эти параметры перспективными для использования в экологической оценке УНМ.

ГЛАВА 7. АНАЛИЗ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ МУНТ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШАХ

Лабораторные мыши традиционно являются модельным объектом, используемым в экотоксикологии, фармакологии и экспериментальной медицине. Поэтому анализ воздействия МУНТ на мышей является важным элементом системы оценки экологической безопасности данного материала как для природных популяций грызунов, играющих ключевую роль в ряде наземных экосистем, так и по отношению к домашним животным и человеку.

В ходе острого и подострого экспериментов не было отмечено случаев гибели животных ни в одной из групп. Отклонений в общем состоянии животных не отмечено, за исключением незначительных нарушений двигательной активности экспериментальных особей, получавших МУНТ в дозе 30 мг/кг в подостром эксперименте.

Минимальные значения массы тела животных зафиксированы в группе «МУНТ 3 мг/кг» и группе, получавшей сажу; максимальные значения – в группе «МУНТ 30 мг/кг». В группах, экспонированных МУНТ в дозах 0,3 и 3 мг/кг, данные показатели статистически значимо не отличались от контроля (рис. 9).

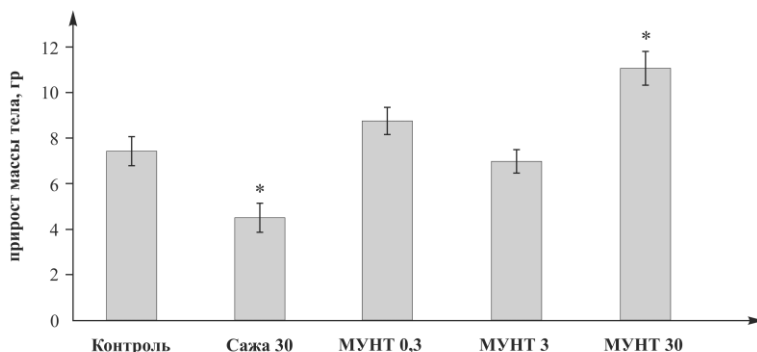


Рис. 9. Среднегрупповой прирост массы тела самцов мышей в подостром эксперименте, % от контроля

* – различие достоверно (при $p < 0,05$) в сравнении со значениями контрольной группы

В ходе подострого эксперимента установлено, что исследованные МУНТ в среднесуточной дозировке 30 мг/кг приводит к гипотрофии печени

(на 15%). В группе «сажа» подобных эффектов не наблюдалось. Выявлено негативное дозозависимое воздействие на структуру печени, почек и лёгких, приводящее к нарушению кровообращения вплоть до кровоизлияний, появлению многочисленных лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов, активизации макрофагальной системы (рис. 10); подобные эффекты для других НМ описаны в ряде исследований (Саяпина и др., 2014; Jackson et al., 2013). Поиск мест локализации НМ в тканях сердца, легких, пищевода, желудка, кишечника, печени, почек, тимуса, селезенки, семенников с помощью ПЭМ не дал результатов, что, вероятно, свидетельствует о биодеградации НМ под действием каталитически активных пероксидаз (Kagan et al., 2010).

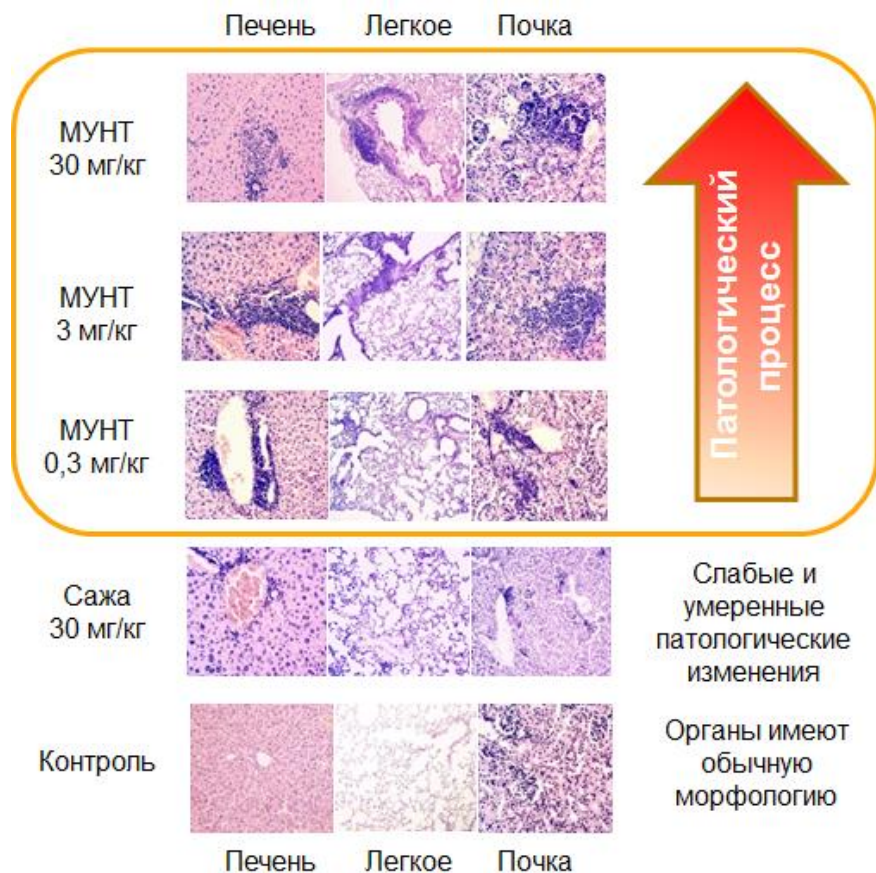


Рис. 10. Гистологические изменения в тканях органов животных в подостром эксперименте. Окраска гематоксилином и эозином; ув. x100 - x400

При этом у животных, гистопатологически обследованных после проведения оценки репродуктивной токсичности (1 мес. после окончания экспозиции), изменения обнаружены только в тканях печени, что может свидетельствовать о возможности восстановления тканей после прекращения экспозиции МУНТ. Цитогистологический анализ семенников с расчетом индекса сперматогенеза отклонений у животных экспериментальных групп не выявил.

В ходе определения уровня кортикостерона в плазме крови самцов мышей были выявлены значимые различия исследуемого показателя в сравнении со значениями контрольной группы, что свидетельствует о выраженной адаптивной реакции (рис. 11).

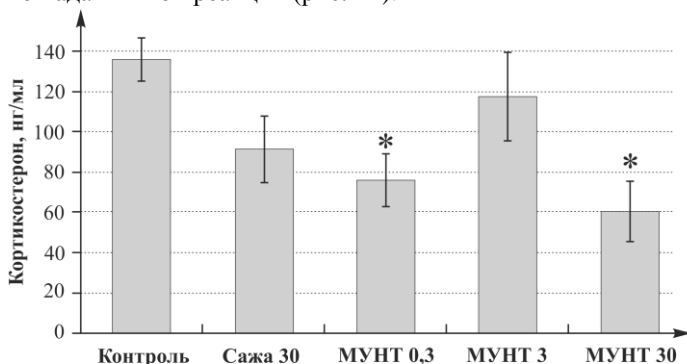


Рис. 11. Кортикостерон в плазме крови самцов мышей, нг/мл

* – различие достоверно (при $p < 0,01$) в сравнении со значениями контрольной группы

Во всех экспериментальных группах уровень кортикостерона был меньше, чем в контрольной. Данный факт может быть обусловлен как постепенным истощением стресс-реализующей системы организма под действием МУНТ, так и изменением метаболизма стероидов.

На рис. 12 представлены результаты ИФА уровня свободного тестостерона в плазме крови экспериментальных животных.

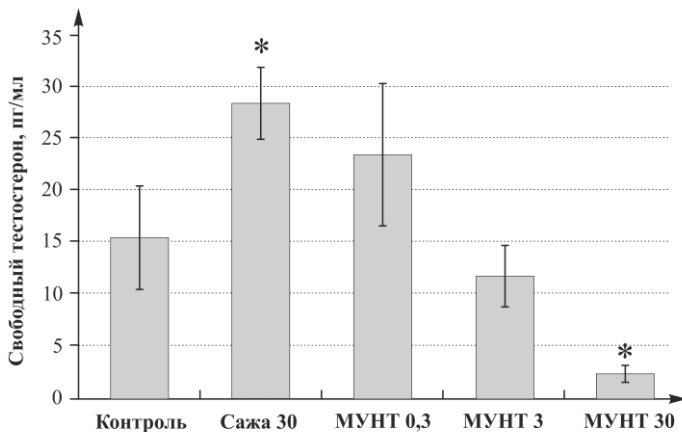


Рис. 12. Показатели уровня свободного тестостерона в плазме крови самцов мышей

* – различие достоверно (при $p < 0,05$) в сравнении со значениями контрольной группы

Хотя достоверных отличий в содержании ЛГ и ФСГ в эксперименте зафиксировано не было, можно отметить дозозависимый эффект, проявляющийся в снижении уровня свободного тестостерона в плазме крови мышей, экспонированных МУНТ. В группе «МУНТ 30 мг/кг» он был существенно ниже контрольных значений ($2,09 \pm 0,39$ и $15,43 \pm 4,93$ соответственно). В группе «сажа» исследуемый показатель превышал контрольные значения ($27,52 \pm 3,76$ и $15,43 \pm 4,93$ соответственно). Данные результаты свидетельствуют о зависимости физиологического эффекта НМ от его структуры (аллотропной модификации).

Оценка оплодотворяющей способности мышей проводилась на основании результатов расчета индекса I , показавших дозозависимый угнетающий эффект во всех экспериментальных группах: вплоть до снижения на 40,4% в группе «МУНТ 30 мг/кг» (рис. 13). В группе «сажа» исследуемый показатель снизился значительно меньше, что свидетельствует о более высокой репродуктивной токсичности МУНТ.

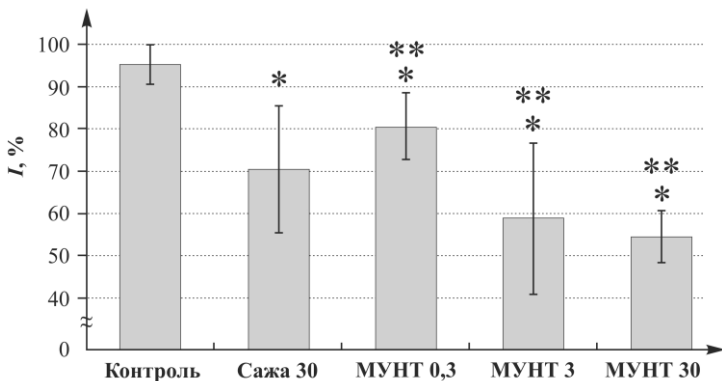


Рис. 13. Среднегрупповые значения индекса оплодотворяющей способности самцов мышей

* – различие достоверно (при $p < 0,01$) в сравнении с значениями контрольной группы;

** – различие достоверно (при $p < 0,01$) в сравнении с значениями групп МУНТ

Таким образом, на примере МУНТ подтверждены данные о том, что печень, почки и лёгкие являются наиболее вероятными органами-мишенями для НЧ (Chen, 2006). Можно предположить, что хроническая инфильтрация паренхимы МУНТ в этих органах приводит к различным патологическим изменениям. Нарушение гормонального баланса и уменьшение значения индекса оплодотворяющей способности самцов свидетельствует о наличии репродуктивной токсичности. Это согласуется с представлениями об индуцировании НМ окислительного стресса, который обуславливается активными формами кислорода, способными провоцировать воспалительные, генотоксические и цитотоксические последствия (Sharma et al., 2007; Murray et al., 2009). На примере лабораторных мышей показано, что исследуемый НМ представляет опасность при попадании в желудочно-кишечный тракт млекопитающих, поскольку в субхроническом исследовании отмечены дозозависимые эффекты, включая изменение массы тела, нарушение гормонального статуса, уменьшение индекса оплодотворяющей способности и повреждающее воздействие на печень, почки и легкие. Значительные нарушения структуры тканей, функционирования эндокринной системы и выраженная репродуктивная токсичность, подтверждают результаты проведенного моделирования (глава 4) и характеризуют уровень экологической опасности исследуемых МУНТ как «высокий».

Используемые в разделе методы исследования показали достаточную чувствительность и избирательность, что делает целесообразным их дальнейшее использование при проведении экологической оценки УНМ.

ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫХ НОРМ ВОЗДЕЙСТВИЯ МУНТ НА БИООБЪЕКТЫ

Сформированный в работе набор методов и подходов позволил определить параметры экологической безопасности ранее не исследованного фактора природно-техногенного происхождения; разработаны предложения по нормам безопасного поступления МУНТ, составляющие для водной среды не более 2 мг/л; для организма млекопитающих (суточная дозировка, перорально) не более 0,3 мг/кг. Выявлены различия в экотоксическом действии, связанные с особенностями структуры молекул и молекулярных комплексов при одинаковом химическом составе углеродных НМ на примере МУНТ и сажи. Применение предлагаемых нами исследовательских алгоритмов, включая проведение идентификации, оценки содержания в средах и пробоподготовки, концептуальное моделирование опасности НМ, использование исследованных в работе тест-объектов, включая *E. coli*, *B. cereus*, «Эколюм», *Sc. quadricauda*, *C. affinis*, *Ch. riparius*, *O. arenaria*, *M. musculus* и тест-функций, включая выживаемость, всхожесть семян, морфометрические показатели, бионакопление, цитогенетический, биохимический и репродуктивный статусы (рис. 14) можно рекомендовать для экологической оценки наноструктурного кристаллического углерода (ОУНТ, МУНТ, фуллерены, графеноподобные материалы).

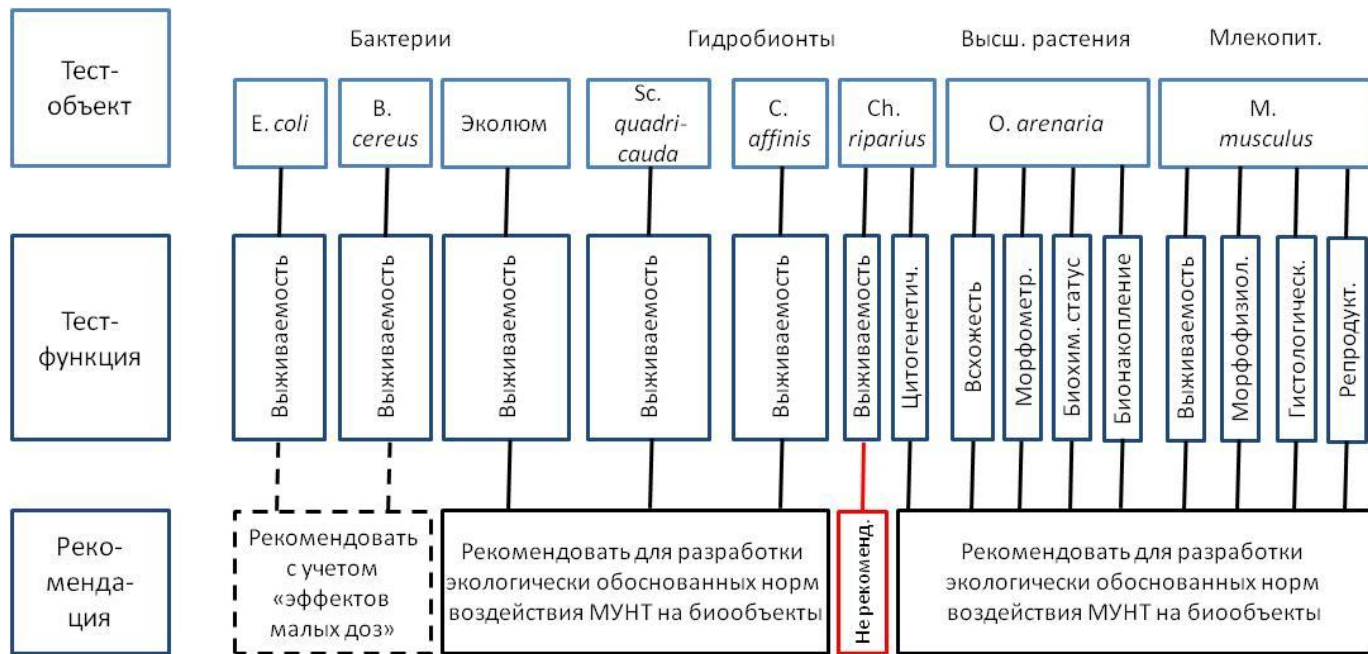


Рис. 14. Анализ применимости тест-объектов и тест-функций для разработки экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты

ВЫВОДЫ:

1. Комплексное биотестирование на представителях различных эколого-функциональных групп подтвердило валидность использованной концептуальной модели, показавшей высокий уровень экологического риска со стороны МУНТ.

2. Созданы методические основы экологической оценки МУНТ, включая алгоритмы идентификации, анализа содержания в средах и моделирования процессов перехода НЧ в биодоступную форму с использованием методов электронной микроскопии, спектрометрии, ультразвуковой обработки, динамического светорассеяния.

3. Экологическая оценка толерантности различных организмов к воздействию МУНТ биохимическими, цитогенетическими, цитологическими, гистологическими и токсикологическими методами на примере исследованных биообъектов выявила тенденцию к уменьшению биоповреждений в ряду одноклеточные сапротрофы и фитопланктон (бактерии, микроводоросли) – зоопланктон (ракообразные, насекомые) – наземные автотрофы (высшие растения) – гетеротрофы-фитофаги (млекопитающие).

4. Установлено проникновение МУНТ в ткани вегетативных органов *O. arenaria* при концентрации 100 и 1000 мг/л, отмечена повышенная биоаккумуляция МУНТ в районе устьиц. Ответные реакции растительного организма выражаются в активизации антиоксидантной и фитогормональной систем, подавлении процессов прорастания семян (в концентрациях 1 мг/л – 10 г/л), стимуляции нарастания стеблей и корней.

5. МУНТ в среднесуточных дозировках 0,3 – 30 мг/кг при пероральном поступлении не вызывает повышения уровня летальности мышей. В субхроническом исследовании отмечены дозозависимые эффекты, включая изменение массы тела, нарушение гормонального статуса, уменьшение индекса оплодотворяющей способности и повреждающее воздействие на печень, почки и легкие.

6. Выявлена специфика экологического воздействия МУНТ по сравнению с сажей, проявляющаяся в усилении стимуляции роста вегетативных частей растений и прорастании семян *O. arenaria*, а также в особенностях изменений морфофизиологических, гистологических и репродуктивных показателей самцов *M. musculus*.

7. Установлена принадлежность МУНТ к веществам III-го класса опасности; показано, что безопасная для бактерий и гидробионтов концентрация МУНТ не превышает 2 мг/л; для организма млекопитающих безопасная среднесуточная дозировка при пероральном поступлении не более 0,3 мг/кг.

8. Определены тест-объекты и тест-функции организмов, применимые для разработки экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Издания Перечня ВАК и приравненные к ним:

1. Гусев А.А., Емельянов А.В., Поздняков А.П. Перспективы исследовательской деятельности лаборатории по изучению воздействия наноматериалов на окружающую среду и здоровье человека на базе ТГУ им. Г.Р. Державина // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2008. Т. 13. № 2-3. С. 210-212.

2. Гусев А.А., Полякова И.А., Горшенева Е.Б., Ткачев А.Г., Емельянов А.В., Шутова С.В., Зайцева О.Н., Федоров А.В., Васильева Т.В. Половые различия физиологического эффекта углеродного наноструктурного материала – перспективного носителя лекарственных препаратов в эксперименте на лабораторных мышах // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер.: Естественные науки. 2010. Т. 21. № 13. С. 107-112.

3. Зайцева О.Н., Поздняков А.П., Головин Ю.И., Гусев А.А., Емельянов А.В., Османов Э.М. Экологические, медицинские и социальные перспективы и угрозы внедрения продукции нанотехнологий // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2010. Т. 15. № 1. С. 38-40.

4. Зайцева О.Н., Поздняков А.П., Головин Ю.И., Гусев А.А., Емельянов А.В., Османов Э.М. Перспективы инновационной деятельности в свете социальных аспектов развития нанотехнологий с учетом зарубежного опыта // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2010. Т. 15. № 1. С. 36-37.

5. Зайцева О.Н., Гусев А.А., Емельянов А.В. Влияние углеродных нанотрубок на некоторые морфологические и физиологические показатели сельскохозяйственных растений // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2010. Т. 15. № 6. С. 1779-1781.

6. Гусев А.А., Зайцева О.Н., Полякова И.А., Горшенева Е.Б., Емельянов А.В., Шутова С.В., Романцова С.В., Семилетова С.В., Ткачев А.Г., Пиляшенко Н.Е. Предварительные результаты комплексного биотестирования углеродного наноматериала – перспективного носителя лекарственных препаратов // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2010. Т. 15. № 5. С. 1538-1540.

7. Яндовка Л.Ф., Гусев А.А., Ткачев А.Г. Влияние углеродного наноструктурного материала на фертильность пыльцы высших цветковых растений // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2011. Т. 16. № 3. С. 953-956.

8. Горшенева Е.Б., Гусев А.А., Шутова С.В., Емельянов С.А., Ткачев А.Г. Углеродный наноструктурный материал – перспективный вектор доставки лекарственных препаратов меняет некоторые функциональные показатели самок *Mus musculus* L. при пероральном введении // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2011. Т. 16. № 1. С. 273-276.

9. Колесникова Т.А., Фёдорова И.А., Гусев А.А., Горин Д.А. Анализ острой токсичности полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных наночастицами оксида цинка, и составляющих их компонентов на гидробионтах // Российские нанотехнологии. 2011. Т. 6. № 3-4. С. 87-96.

10. Гусев А.А., Емельянов А.В., Шутова С.В., Ткачев А.Г., Годымчук А.Ю., Кузнецов Д.В. Экотоксикологическое исследование углеродного наноструктурного материала // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. 2011. №15 (110). Вып. 16. С. 80-86.

11. Смирнова Е.А., Гусев А.А., Зайцева О.Н., Лазарева Е.М., Онищенко Г.Е., Кузнецова Е.В., Ткачев А.Г., Феофанов А.В., Кирпичников М.П. Углеродные нанотрубки проникают в ткани и клетки и оказывают стимулирующее воздействие на проростки эспарцета *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser. // Acta naturae. 2011. Т. 3. № 1(8). С. 99-106.

12. Убогов А.Ю., Полякова И.А., Гусев А.А., Горшенева Е.Б., Ткачев А.Г. Углеродные нанотрубки как фактор развития воспалительного процесса в печени мышей // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2011. Т. 16. № 5. С. 1338-1342.

13. Головин Ю.И., Гусев А.А., Тюрин А.И., Белянская О.В., Крамской В.В. Анализ российских и международных нормативных документов в области структурной и токсикологической характеристики наноматериалов как источников повышенного эколого-санитарного риска // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2012. Т. 17. № 2. С. 617-623.

14. Гусев А.А.; Копытова Н.Е.; Дудов А.С.; Захарова О.В.; Полякова И.А.; Зайцева О.Н.; Емельянов А.В. Применение метода математического моделирования и электронной базы данных в экотоксикологической оценке потенциальной опасности углеродного наноструктурного материала // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. 2012. № 9 (128). Вып. 19. С. 140-146.

15. Акимова О.А., Гусев А.А., Зайцева О.Н., Ткачев А.Г. Исследование изменений морфометрических параметров молодых растений под влиянием многостенных углеродных нанотрубок – перспективного материала для биотехнологий // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки, 2012. Т. 17. № 4. С. 1172-1175.

16. Гусев А.А., Федорова И.А., Ткачев А.Г., Годымчук А.Ю., Кузнецов Д.В., Полякова И.А. Острое токсическое и цитогенетическое действие

углеродных нанотрубок на гидробионтов и бактерии // Российские нанотехнологии. 2012. Т. 7. № 9-10. С. 71-77.

17. Васюкова И.А., Гусев А.А., Захаров Н.А., Сенцов М.Ю. Оценка биосовместимости композита наноструктурного гидроксипатита кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ с углеродными нанотрубками как перспективного материала для эндопротезирования // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18. № 1. С. 304-308.

18. Гусев А.А., Родаев В.В., Васюкова И.А., Ткачев А.Г., Захарова О.В., Зрютина А.В. Исследование содержания аэрозольных наночастиц в воздухе рабочей зоны нанотехнологического производства и оценка воздействия наноматериала на бактерии на примере углеродного наноматериала «Таунит» // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18. № 1. С. 299-303.

19. Васюкова И.А., Гусев А.А., Халиуллин Т.О., Фатхутдинова Л.М., Убогов А.Ю. Многостенные углеродные нанотрубки и их влияние на показатели мужской репродуктивной системы // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2014. №1. С. 10-15.

20. Шляхтин Г.В., Емельянов А.В., Гусев А.А. Биологическая диагностика и мониторинг как средства контроля воздействий техногенных систем и их компонентов на состояние окружающей среды. Постановка проблемы. Алгоритм реализации научных программ // Вестник Тамбовского университета. Сер.: Естественные и технические науки. 2014. Т. 19. № 5. С. 1626-1629.

21. Грибановский С.Л., Васюкова И.А., Гусев А.А., Ткачев А.Г. Математическое моделирование последствий воздействия углеродных нанотрубок на динамику численности мышевидных грызунов // Научные Ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. 2015. № 3 (200). Вып. 30. С. 102-110.

22. Gusev A.A. et al. Reproductive toxicity of carbon nanostructured material – a promising carrier of drugs in laboratory mice // Journal of Physycs Conference Series. 2011. 291 012052.

23. Smirnova E., Gusev A., Zaytseva O., Sheina O., Tkachev A., Kuznetsova E., Lazareva E., Onishchenko G., Erokhina M., Feofanov A., Kirpichnikov M. Uptake and accumulation of multiwalled carbon nanotubes changes the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings // Frontiers of Chemical Science and Engineering. 2012. Vol. 6. Issue 2. P. 132-138.

24. Gusev A.A., Akimova O.A., Zakharaova O.V., Godymchuk A.Yu., Krutyakov Yu.A., Klimov A.I., Denisov A.N., Kuznetsov D.V. Morphometric and Biochemical Characteristics of Oilseed Rape Exposed to Fine-dispersed Metallurgical Sludge, Silver Nanoparticles and Multi-wall Carbon Nanotubes // Advanced Materials Research. 2014. Vol. 880. P. 212-218.

25. Zakharov N.A., Gusev A.A., Sentsov M.Yu., and Vasyukova I.A. Synthesis, Properties, and Biocompatibility of a $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ /Carbon Nanotube Nanocomposite // *Inorganic Materials*. 2014. Vol. 50. № 7. P. 873-881.

26. Gusev A.A., Zaytseva O.N., Selivanova O.A., Zakharova O.V., Godymchuk A.Y., Kuznetsov D.V., Tkachev A.G. Impact of Multi-Walled Carbon Nanotubes to Rye Seedlings // *Advanced Materials Research*. 2015. Vol. 1085. P. 237-241.

27. Vasyukova I.A., Gusev A.A., Ubogov A.Y., Godymchuk A.Yu. Study of MWNTS Influence upon Liver Histological and Histochemical Parameters in Laboratory Mice: Preliminary Results // *Advanced Materials Research*. 2015. Vol. 1085. P. 376-383.

28. Vasyukova I.A., Gribovskii S.L., Gusev A.A., Ubogov A.Yu., Khaliullin T.O., Fatkhutdinova L.M., Tkachev A.G. Assessment of Reproductive Toxicity of Multiwalled Carbon Nanotubes and Their Putative Effects on Population Ecology of Mouselike Rodents // *Nanotechnologies in Russia*. 2015. Vol. 10. № 5-6, P. 458-467.

29. Godymchuk A.Yu., Karepina E.E., Yunda E.N., Bozhko I.A., Lyamina G.V., Kuznetsov D.V., Gusev A.A., Kosova N. Aggregation of manufactured nanoparticles in aqueous solutions of mono- and bivalent electrolytes // *Journal of Nanoparticle Research*. Vol. 17:211. № 5. 2015. doi:10.1007/s11051-015-3012-7.

30. Zakharova O.V., Godymchuk A.Yu., Gusev A.A., Gulchenko S.I., Vasyukova I.A., Kuznetsov D.V. Considerable Variation of Antibacterial Activity of Cu Nanoparticles Suspensions Depending on the Storage Time, Dispersive Medium, and Particle Sizes // *BioMed Research International*. Vol. 2015, Article ID 412530, 11 p., 2015. doi:10.1155/2015/412530.

Учебно-методические пособия:

1. Гусев А.А., Годымчук А.Ю., Полякова И.А., Захарова О.В., Родаев В.В. Токсикологическое влияние наночастиц на здоровье млекопитающих. Рег. свид. №25843 от 04.04.2012 г. № гос. рег. 0321201076; 71 с (1,19 Мб).

2. Безопасность наноматериалов: учебное пособие / Гусев А.А., Годымчук А.Ю., Емельянов А.В., Захарова О.В., Кузнецов Д.В. М-во образования и науки РФ. Тамбов: Издательский дом ТГУ им. Г.Р. Державина, 2013. 133 с.

Объекты интеллектуальной собственности:

1. Гусев А.А., Копытова Н.Е., Дудов А.С., Захарова О.В., Полякова И.А., Зайцева О.Н. База данных «Биобезопасность наноматериалов» (правообладатель – ТГУ имени Г.Р. Державина). Зарегистрирована в Реестре баз данных Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам за № 2011620488 29.06.2011 г.

2. Шеина О.А., Гусев А.А., Захарова О.В., Кузнецов Д.В., Годымчук А.Ю. Ноу-хау «Способ ультразвуковой обработки многокомпонентных смесей» (правообладатель – ТГУ имени Г.Р. Державина). Свид. №2012-0002 от 17.09.2012 г.

3. Кузнецов Д.В., Колесников Е.А., Гусев А.А., Чупрунов К.О., Лёвина В.В. Ноу-хау «Метод мониторинга концентрации аэрозольных частиц» (правообладатель – НИТУ «МИСиС»). Свид. №93-217-2013 ОИС от 09.12.2013 г.

4. Шуклинов А.В., Гусев А.А., Захарова О.В., Васюкова И.А., Кузнецов Д.В., Годымчук А.Ю. Ноу-хау «Способ приготовления водных суспензий высокодисперсных материалов с использованием ультразвуковой обработки» (правообладатель – ТГУ имени Г.Р. Державина). Свид. №2013-0002 от 19.06.2013 г.

Статьи в сборниках материалов и докладов: всего 19.

Тезисы докладов на совещаниях и конференциях: всего 39.

Подписано в печать 05.12.2016 г. Формат 60×48/16. Объем 2,0 п.л.
Тираж 150 экз. Заказ №1051. Бесплатно.
392008, г. Тамбов, ул. Советская, 190г. Типография Издательского дома
Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина