

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего
профессионального образования «Тамбовский государственный университет
имени Г.Р. Державина»

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Томский
государственный университет»

На правах рукописи



Гусев Александр Анатольевич

**Экотоксикологические характеристики
высокодисперсного кристаллического углерода**

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, доцент,
Емельянов Алексей Валерьевич

Иркутск – 2016

Оглавление

| | |
|--|-----|
| Список используемых сокращений и аббревиатур..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ, МЕТОДИЧЕСКОЙ И НОРМАТИВНО-ПРАВОВОЙ БАЗЫ В ОБЛАСТИ БЕЗОПАСНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 13 |
| 1.1 Нанотехнологии и наноматериалы..... | 13 |
| 1.2 Безопасность углеродных наночастиц как часть проблемы безопасности наноматериалов..... | 18 |
| 1.2.1 Источники поступления наноматериалов в окружающую среду..... | 19 |
| 1.2.2 Миграция в окружающей среде и экологические эффекты наночастиц..... | 30 |
| 1.2.3 Влияние наночастиц на растительные организмы..... | 43 |
| 1.2.4 Воздействие наноматериалов на млекопитающих..... | 66 |
| 1.3 Нормативно-правовое регулирование в сфере безопасности нанотехнологий..... | 83 |
| 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 94 |
| 2.1 Характеристика исследуемого материала..... | 94 |
| 2.2 Методики исследований..... | 95 |
| 2.2.1 Электронно-микроскопические исследования многостенных углеродных нанотрубок..... | 95 |
| 2.2.2 Определение концентрации наночастиц в атмосфере..... | 95 |
| 2.2.3 Получение водных дисперсий на основе многостенных углеродных нанотрубок..... | 96 |
| 2.2.4 Концептуальное моделирование уровня потенциальной опасности наноматериала..... | 97 |
| 2.2.5 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на выживаемость бактерий <i>E. coli</i> и <i>B. cereus</i> | 99 |
| 2.2.6 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по интенсивности гашения биолюминесценции бактерий <i>E. coli</i> M-17..... | 101 |
| 2.2.7 Оценка экотоксичности многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости цериодафний <i>C. affinis</i> | 101 |
| 2.2.8 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости микроскопических зеленых водорослей <i>Sc. quadricauda</i> | 102 |
| 2.2.9 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости и цитогенетическим эффектам личинок насекомых <i>Ch. riparius</i> | 102 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 2.2.10 | Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на высшие растения..... | 104 |
| 2.2.11 | Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на организм млекопитающих..... | 121 |
| 3 | АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ В СРЕДАХ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПЕРЕХОДА МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В БИОДОСТУПНУЮ ФОРМУ.... | 130 |
| 4 | ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК МЕТОДОМ КОНЦЕПТУАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ..... | 144 |
| 5 | ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БАКТЕРИИ И ГИДРОБИОНТЫ..... | 156 |
| 6 | ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК К БИОАККУМУЛЯЦИИ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ И СОПУТСТВУЮЩИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ..... | 163 |
| 6.1 | Влияние многостенных углеродных нанотрубок на показатели всхожести и морфометрические параметры эспарцета песчаного..... | 163 |
| 6.2 | Результаты микроскопического исследования..... | 166 |
| 6.3 | Результаты анализа биохимического статуса растений..... | 171 |
| 7 | АНАЛИЗ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШАХ..... | 179 |
| 7.1 | Влияние многостенных углеродных нанотрубок на лабораторных мышей в остром эксперименте..... | 179 |
| 7.2 | Воздействие многостенных углеродных нанотрубок на лабораторных мышей в подостром эксперименте..... | 183 |
| 8 | РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫХ НОРМ ВОЗДЕЙСТВИЯ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БИООБЪЕКТЫ..... | 198 |
| | ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 204 |
| | Список использованных источников..... | 206 |

Список используемых сокращений и аббревиатур

ДУНТ – двустенные углеродные нанотрубки

МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки

НМ – наноматериал

НЧ – наночастица

ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УНМ – углеродный наноматериал

УНТ – углеродные нанотрубки

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ 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. Среди них выделяется 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, 2003; Murr, Guerrero, 2006), способны сохраняться и накапливаться в окружающей среде (Klaine et al., 2012; Murr et al., 2004; Murr et al., 2006), 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., 2012; 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 et al., 2010). Это связано с относительно недавним открытием их существования (Lijima, 1991) и сложностью выделения для исследования в чистом виде из природных продуктов (Edgington et al., 2010). Важной 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 материалы и методы появились с развитием нанотехнологий в последние десятилетия, в связи с чем отмечается экспоненциальный рост числа публикаций, демонстрирующих негативные эффекты наночастиц (НЧ) с характерным размером менее 100 нм (Алексеева, 2007; Donaldson et al., 2004; Oberdorster et

al., 2005; Nel et al., 2009; Elsaesser, Howard, 2012). Существенная часть исследований в данной области фокусируется на УНТ, отличающихся гидрофобностью, химической стойкостью и высокой проникающей способностью (Лысцов, Мурзин, 2007; Годымчук и др., 2012; Фатхутдинова и др., 2013; Саяпина и др., 2014).

Однако имеющиеся данные разрознены и зачастую противоречивы. Отмечается, что определение опасности наноматериала (НМ) по аналогии с уже изученными образцами может дать искаженные результаты (<http://www.iisd.ca/vol15/enb15160e.html>). Если для одностенных УНТ (ОУНТ) продемонстрирована возможность биоаккумуляции в тканях высших растений (Khodakovskaya et al., 2009), то для более массово промышленно синтезируемых 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», синтезируемые в промышленных масштабах (Ткачев и др., 2007). 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).

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 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 НМ в водной среде, составляющая 2 мг/л для микроводоросли *Sc. quadricauda*. На полигенных 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.

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.). Результаты исследований используются 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 НИ 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); №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 др.

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» (Анталия, 2014); 1-3 Международных научно-практических конференциях «Междисциплинарные проблемы нанотехнологий биомедицины и нанотоксикологии наук» (Тамбов, 2013-2015), IV-ой Международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы» (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, и заключения, содержащего выводы. Список цитируемой литературы включает 293 источника, в том числе 174 на иностранных языках. Диссертация изложена на 238 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», стимуляции цитогенетической и ферментативной активности.

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

4. Рекомендуются следующие ориентировочные 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. Показано, что использованные при исследовании эффектов МУНТ 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.А. Селивановой и О.В. Захаровой; 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.

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

1.1 Нанотехнологии и наноматериалы

Биосфера с самых ранних этапов своей эволюции была насыщена объектами нанометрового диапазона (частицы неорганического и органического вещества; макромолекулы, включая белки и нуклеиновые кислоты; вирусные частицы). Однако только с развитием нанотехнологических подходов появились как методы прецизионного исследования таких объектов, так и новый источник их поступления в окружающую среду – наноиндустрия. При этом промышленные НЧ, обладая рядом уникальных характеристик, пока в значительной степени являются «белым пятном» в экологических исследованиях. Это относится и к НЧ природного происхождения, которые до недавнего времени практически не рассматривались в качестве самостоятельного экологического фактора. Для понимания особенностей, определяющих поведение нанообъектов в окружающей среде и характер их воздействия на живые организмы необходимо подробнее остановиться на ключевых принципах и понятиях нанотехнологий.

Нанотехнологии (НТ) – одно из важнейших направлений развития современной науки и техники (Фостер, 2008). Среди сфер применения достижений НТ – конструкционные материалы, микроэлектроника, оптика, энергетика, военное дело, транспорт, биотехнологии, медицина, охрана окружающей среды, сельское хозяйство (Головин, 2007).

Идея НТ принадлежит лауреату Нобелевской премии по физике за 1965 г. Ричарду Фейнману. Первое упоминание методов, которые впоследствии будут названы НТ, связывают с его известным выступлением «There's Plenty

of Room at the Bottom», сделанным в 1959 году. Впервые термин «нанотехнология» употребил Норио Танигути в 1974 году. Он назвал этим термином производство изделий размером несколько нанометров. В 1980-х годах этот термин использовал Эрик К. Дрекслер в своих книгах: «Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology» и «Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation». Центральное место в его исследованиях играли математические расчёты, с помощью которых можно было проанализировать работу устройства размерами в несколько нанометров.

НТ – совокупность приемов и методов, применяемых при изучении, проектировании, производстве и использовании наноструктур, устройств и систем, включающих целенаправленный контроль и модификацию формы, размера, взаимодействия и интеграции составляющих их наномасштабных элементов (около 1-100 нм), для получения объектов с новыми химическими, физическими, биологическими свойствами.

Практический аспект НТ включает в себя производство устройств и их компонентов, необходимых для создания, обработки и манипуляции атомами, молекулами и НЧ. Подразумевается, что не обязательно объект должен обладать хоть одним линейным размером менее 100 нм – это могут быть макрообъекты, атомарная структура которых контролируемо создаётся с разрешением на уровне отдельных атомов, либо же содержащие в себе нанообъекты. В более широком смысле этот термин охватывает также методы диагностики, характерологии и исследований таких объектов.

НТ качественно отличаются от традиционных дисциплин, поскольку на таких масштабах привычные, макроскопические технологии обращения с материей часто неприменимы, а микроскопические явления, пренебрежительно слабые на привычных масштабах, становятся намного значительнее: свойства и взаимодействия отдельных атомов и молекул или агрегатов молекул (например, силы Ван-дер-Ваальса), квантовые эффекты.

НТ, включая молекулярные технологии, – новая, малоисследованная дисциплина. Основные открытия, предсказываемые в этой области, пока не сделаны. Тем не менее, проводимые исследования уже дают практические результаты. Использование в НТ передовых научных достижений позволяет относить её к высоким технологиям.

Развитие современной электроники идёт по пути уменьшения размеров устройств. С другой стороны, классические методы производства подходят к своему естественному экономическому и технологическому барьеру, когда размер устройства уменьшается ненамного, зато экономические затраты возрастают экспоненциально. НТ – следующий логический шаг развития электроники и других наукоёмких производств.

НМ – материалы, созданные с использованием НЧ и/или посредством НТ, обладающие какими-либо уникальными свойствами, обусловленными присутствием этих частиц в материале. К НМ относят объекты, один из характерных размеров которых лежит в интервале от 1 до 100 нм. К числу НМ относятся нанотрубки, нанокompозиты, пористые материалы, фуллерены, ультрадисперсные порошки, фотонные кристаллы, тонкие плёнки и поверхностные слои, жидкие кристаллы, липосомы, микроэмульсии (Головин, 2011; Гусев, 2007; Gusev, 2004).

Углеродные НМ (УНМ) – это материалы, состоящие из больших (иногда гигантских) молекул, которые, в свою очередь, построены исключительно из атомов углерода. Главная особенность этих молекул – это их каркасная форма. В последнее время наиболее исследуемыми из них являются фуллерены, углеродные нанотрубки и графены.

Фуллерены (Рис. 1) – аллотропные кластерные формы углерода, в которых атомы расположены в вершинах правильных шести и пятиугольников, покрывающих поверхность сферы или сфероида. Такие сферы могут содержать от 20 до 540 атомов углерода и их обозначают C_{20} , C_{60} , C_{70} , C_{540} . Фуллерен раньше иногда называли бакминстерфуллерен или бакибол (bucky-ball).

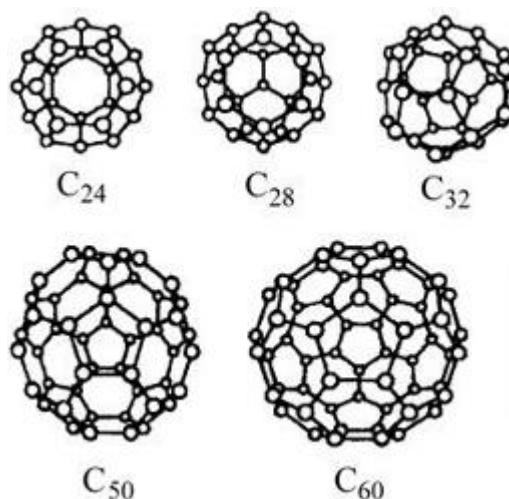


Рисунок 1 – Фуллерены (по Головин, 2011)

В отличие от сферических молекул графена, углеродные нанотрубки (тубулены, нанотрубы, УНТ) представляют собой наноструктуры трубчатой формы, диаметром 0,7 – 200 нм длиной до долей миллиметра, иногда и более, состоящие из одного или нескольких слоев. Их нужно отличать от микротрубок, которые в диаметре составляют 0,3 – 10 мкм. Хотя сообщения о наблюдении тубулированных структур углерода поступали с 1950-х годов, их открытие считается совершенным Сумио Иидзимой в 1991 году (Iijima, 1991). УНТ это – пятая аллотропная модификация углерода. По количеству слоев они различают (ОУНТ) и многостенные (МУНТ) (Рис 2).

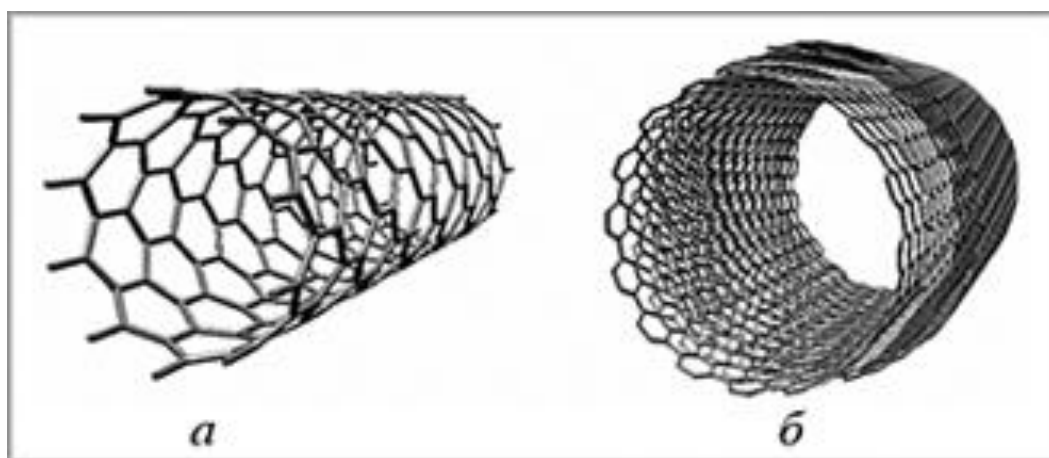


Рисунок 2 – Структура (а) ОУНТ и (б) МУНТ (по Гусев, 2007)

Расстояние между графитовыми слоями УНТ составляет 3,4 Å. По форме сечения они могут представлять собой идеальный круг, эллипс или многоугольник. На концах УНТ могут быть открытыми или закрытыми шапочками (головками) в виде полусферы, конуса, усеченного конуса и т.д. Упорядоченные скопления нанотрубок (Рис. 3) могут представлять собой жгуты (Головин, 2011; Гусев, 2007; Gusev, 2004).

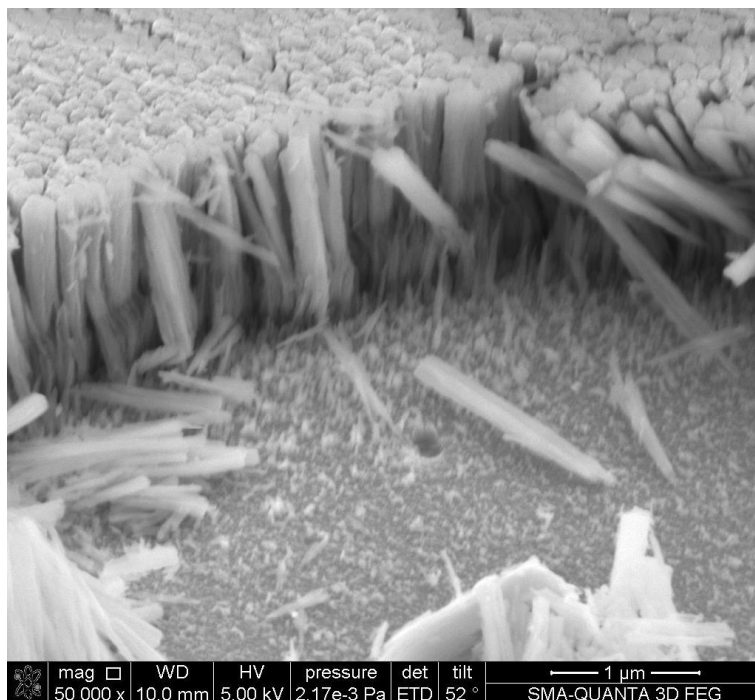


Рисунок 3 – Вертикально ориентированные к подложке жгуты УНТ, выращенные с помощью магнетронного осаждения (по Гусев, 2007)

Свойствами УНТ можно в определенной мере управлять путем изменения их хиральности, т. е. направления закручивания их решетки относительно продольной оси. Получают нанотрубки как с металлическим типом проводимости, так и с заданной шириной запрещенной зоны.

УНТ не растворяются и трудно диспергируются в растворителях, что затрудняет как их модифицирование, так и проведение разнообразных исследований, включая эколого-биологические. Подходы, позволяющие модифицировать нанотрубки для их практического использования, можно разделить на три группы: 1) модифицирование дефектов; 2) нековалентная

(супрамолекулярная) модификация; 3) ковалентная модификация боковых стенок (Головин, 2011; Гусев, 2007; Gusev, 2004).

Если расщепить ОУНТ в продольном направлении, то получится двумерная структура, называемая графен – монослой графита, состоящий из атомов углерода, объединенных посредством sp^2 связей в гексагональную кристаллическую решетку. По оценкам, графен обладает большой механической жёсткостью и хорошей теплопроводностью (~ 1 ТПа и $\sim 5 \times 10^3$ Вт·м $^{-1}$ ·К $^{-1}$ соответственно). Высокая подвижность носителей тока при комнатной температуре делает его перспективным материалом для использования в самых различных приложениях, в частности, как будущую основу нанoeлектроники и энергетики. Основной из существующих в настоящее время способов получения графена состоит в механическом отщеплении или отшелушивании слоёв графита. Используется также упомянутый выше способ получения графена – разрезание однослойных нанотрубок и распрямление их в плоскость (Головин, 2011; Гусев, 2007; Gusev, 2004).

1.2 Безопасность углеродных наночастиц как часть проблемы безопасности наноматериалов

По сравнению с веществами в обычном физико-химическом состоянии, НМ могут обладать совершенно иными физико-химическими характеристиками и биологическим (в том числе токсическим) действием (Постановление Главного... 2007), являясь для живой природы нехарактерными мелкодисперсными поллютантами с малоизученными токсикологическими свойствами. В России и за рубежом значительное число исследований последнего десятилетия посвящено проблеме безопасности УНМ (Саяпина и др., 2014; Bellucci, 2009; Aschberger, 2010; Petra, 2013).

Результаты исследований токсичности синтезированных НМ довольно противоречивы и вызывают много вопросов (Новая дисциплина... 2006).

Однако отсутствие токсикологических данных не должно привести к превентивной приостановке нанотехнологических исследований. Наоборот, следует бороться за трезвый баланс между дальнейшим развитием НТ и исследованиями, необходимыми для определения потенциальной опасности. Хотя токсикология конкретного материала может быть хорошо определенной, токсичность его наноразмерной формы может разительно отличаться. Очень важно, чтобы правительственные органы и промышленность ассигновали достаточные ресурсы для проведения научно обоснованной оценки риска. Разумно было бы рассмотреть проблемы окружающей среды и здравоохранения до широкого распространения НТ (Oberdörster et al., 2005).

1.2.1 Источники поступления наноматериалов в окружающую среду

В настоящее время уже можно говорить о пользующихся спросом товарах, содержащих НМ, и, соответственно, о реальных технологиях, производительность которых достигает сотен тонн в год в развитых странах. Важно отметить, что в целом разработки соответствующих технологий и материалов ведутся во всех странах, имеющих программы по НТ (США, Япония, Китай, Великобритания, Германия, Франция, Россия, Бельгия и др.).

Промышленные источники поступления НМ в окружающую среду представляют собой собственно потребительские товары, содержащие НЧ, крупнотоннажные производства, а также сотни опытно-промышленных и научно-исследовательских лабораторий по всему миру, в которых в тех или иных количествах получают НМ каждый день (Годымчук и др., 2012).

Поступление НЧ из потребительской продукции.

Среди множества производимых в лабораториях НМ на сегодняшний день в потребительских товарах широко представлены НЧ оксидов металлов (TiO_2 , ZnO), металлов (например, Ag) и углерода.

НЧ диоксида титана производятся в больших количествах для самоочищающихся, необрастающих, противомикробных покрытий, красок,

паст (в том числе зубных), а также для катализаторов и фотокатализаторов. На строительном рынке широкое распространение получили покрытия на основе НЧ TiO_2 (лаки и фасадные краски, цемент, торговая марка Bianco TX Millenium). Добавка диоксида титана дает возможность уменьшить объемы оксидов азота, серы, аммиака, диоксида углерода и летучих органических соединений в окружающей среде, что благоприятно сказывается на чистоте окружающего воздуха и способствует решению проблемы городского смога.

НЧ оксида цинка также проявляют антибактериальные и фотокаталитические свойства. На настоящий момент частицы ZnO используются в качестве антисептиков в зубной пасте и косметике, краске, пластике и текстиле (Годымчук и др., 2012).

Благодаря фотокаталитической активности TiO_2 и ZnO и поглощению света в УФ диапазоне оксид цинка и диоксид титана получили широкое распространение в солнцезащитных кремах. Только в Австралии имеется более 300 зарегистрированных солнцезащитных продуктов, содержащих НЧ TiO_2 (Алексеева, 2008). Среди фирм, производящих косметические продукты с использованием НЧ, фигурирует такая известная компания, как L'Oreal. Сравнительный анализ солнцезащитных кремов показал, что из 1200 кремов 228 содержат оксид цинка, 363 содержат диоксид титана и 73 – содержат оба этих элемента. При этом в 70 % кремов, содержащих диоксид титана, и в 30 % кремов, содержащих оксид цинка, эти элементы находятся в форме НЧ (Serpone et al., 2007).

Во всех случаях не исключается, даже предполагается контакт НЧ с человеком и поступление их в окружающую среду после использования (Годымчук и др., 2012).

Серебро в наноформе обладает бактерицидными свойствами. На этом основано его активное использование в качестве добавок в чистящие средства, металлические изделия, косметику и текстиль, при использовании которого бактерии эффективно уничтожаются по сравнению с одеждой, не содержащей НЧ серебра (<http://www.noski47.tu1.ru.>).

На рынке уже доступны различные биодобавки на основе НЧ серебра (1–20 нм), применяющиеся для косметических и санитарно-гигиенических средств: очищения кожи, заживления ран, подавления воспаления, стимулирования иммунной системы, регенерации клеток, профилактики аллергических заболеваний, например, «Colloidal Silver», Украина (www.nanosvit.ucoz.ru). Тем не менее, следует отметить небольшую разницу терапевтических и токсических концентраций серебра, что затрудняет его широкое применение в биомедицине.

Среди УНМ широко используются УНТ, сферами применения которых являются спортивные товары (нанотрубки входят в состав композитов, из которых они изготавливаются), электроника и автомобилестроение (здесь УНТ используются для придания полимерам антистатических и проводящих свойств). Не менее 18–20 % объемов потребления углеродных волокон приходится на изготовление спортивного инвентаря (клюшки для гольфа, хоккея, лыжные палки, спиннинги, сноуборды, доски для серфинга, бейсбольные биты). Чтобы удержаться в условиях высокой конкуренции, производители спортивного снаряжения вынуждены постоянно разрабатывать не только новый дизайн, но и использовать новые материалы для их изготовления и т.д. Предполагается, что глобальный спрос на УНТ со стороны производителей товаров для спорта и отдыха будет расти примерно на 3 % в год (Ким, 2009).

В стоимостном выражении объем рынка УНТ в 2009 году достиг 252 млн. долларов, а к 2014 году эта цифра выросла более чем в 4 раза и составила более 1 млрд. долларов. По сравнению с 2007 годом производство УНТ к 2014 году выросло в 13 раз. Такое значительное увеличение рынка стало возможным благодаря расширению сфер применения УНТ и удешевлению данного вида продукции. Если ранее нанотрубки использовались в основном в электронике, автомобильной, аэрокосмической и оборонной промышленности, то к 2014 году такие сферы применения как одежда специального назначения, медицина и спортивные товары суммарно

занимали более 30 %. Это дает основание опасаться того, что НЧ при носке, стирке, утилизации одежды, утилизации спортивного инвентаря могут попадать в атмосферу, биосферу и литосферу, а, следовательно, влиять на состояние экосистем (Годымчук и др., 2012).

Целый набор свойств, среди которых высокая прочность (63 ГПа), сверхпроводимость, капиллярные, оптические, магнитные характеристики и т.д., позволяют УНТ найти применение в огромном количестве областей. Это добавки в полимеры, катализаторы (автоэлектронная эмиссия для катодных лучей осветительных элементов, плоские панели дисплеев, газоразрядные трубки в телекоммуникационных сетях), поглощение и экранирование электромагнитных волн, преобразование энергии, аноды в литиевых батареях, хранение водорода, композиты (заполнители или покрытия), нанозонды, датчики, усиление композитов, суперконденсаторы.

В перспективе электроника будет продолжать доминировать среди областей применения нанотрубок, однако большие возможности также связаны с медицинским и энергетическим рынками.

Быстро развивающимся направлением в России и за рубежом является применение различных НМ для строительной промышленности. При этом на строительном рынке выделяются краски, производимые на основе нанопорошков (наногрунтовка Dali, производитель «Рогнеда»), или суперконцентраты для полимеров на основе нанопорошков металлов, керамики и наноглин. Куда больший интерес представляет продукция, созданная на основе НМ, которые значительно улучшают свойства конечных изделий. К ним, например, относятся УНТ, фуллерены, НЧ металлов и др. Добавление фуллеренов в краски оказывает структурирующее воздействие на формирующийся при горении пенококс и способствует сохранению адгезии (Зыбина и др., 2003).

Однако результаты многочисленных исследований показывают, что не стоит недооценивать экотоксикологические риски, связанные с массовым производством УНТ. Многие ученые полагают, что интенсивное

производство этих материалов может серьезно повлиять на экологическую безопасность.

Способы и области выделения НЧ из потребительских товаров

Так как основными компонентами НМ являются НЧ, наноплёнки и нановолокна, то они могут попасть в окружающую среду разными путями на протяжении всего цикла их жизни – получения, обработки, перевозки, использования и утилизации продукции. Даже если они используются в электронике, шинах, топливных элементах и многих других продуктах в виде компонентов компактных материалов, возможны утечки или выход в результате износа в период использования. Наконец, попадая в мусорные свалки с выбрасываемыми после употребления материалами и устройствами, они могут загрязнять окружающую среду, как при переработке отходов, так и при их сжигании или естественных процессах распада при хранении (Алексеева, 2007).

К сожалению, невозможно найти перечень всей продукции, содержащей НЧ. Многие производители не информируют об их наличии в силу того, что безопасность некоторых НМ до сих пор еще не доказана. Можно предположить, что в связи с активизацией нанотоксикологических исследований в ближайшие годы ситуация изменится к лучшему. Данные, представленные в таблице 1 (Mueller, Nowack, 2008), демонстрируют выделение НЧ в окружающую среду при использовании НМ текстильной, косметической, металлообрабатывающей и электронной промышленности в Швейцарии.

Таблица 1 – Выделение НЧ в окружающую среду при использовании потребительских товаров (на примере Швейцарии)

| № п/п | Категория изделий | Способ выделения НЧ при использовании изделий | Содержание наночастиц в изделии, % масс. | Область выделения | Выделение НЧ, % |
|-------|-------------------------------------|---|--|---|------------------------|
| НЧ Ag | | | | | |
| 1. | Товары из текстиля | стирка сжигание мусора разложение | 10 | воздух канализация литосфера, биосфера | 7,5 5,0 85 |
| 2. | Косметические средства | нанесение на кожу смывание разложение | 25 | канализация воздух | 95 5,0 |
| 3. | Моющие, чистящие средства, аэрозоли | распыление смывание разложение | 15 | воздух, почва, канализация | 100 |
| 4. | Металлическая продукция | истирание сжигание мусора разложение | 5 | канализация биосфера воздух биосфера | 5 47,5 2,5 45 |
| 5. | Пластмассы | истирание сжигание отходов разложение | 10 | канализация воздух биосфера | 5 50 45 |

| | | | | | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|----|---|----------------|
| 6. | Лакокрасочные товары | утечка утилизация | 35 | почва, воздух канализация биосфера | 5 45 50 |
| НЧ TiO ₂ | | | | | |
| 7. | Полимерные изделия | истирание сжигание отходов | 2 | канализация воздух, литосфера | 5 95 |
| 8. | Косметические средства | использование смывание | 60 | Канализация воздух | 95 5 |
| 9. | Металлические изделия | истирание | 1 | канализация биосфера воздух | 5 90 5 |
| 10. | Лакокрасочные товары | утечка утилизация | 25 | Канализация почва | 50 50 |
| НМ на основе углерода | | | | | |
| 11. | Пластмассы, спортивное оборудование | истирание сжигание отходов | 50 | литосфера, биосфера, воздух | 5 95 |
| 12. | Электроника, батареи | использование сжигание отходов | 50 | биосфера воздух литосфера | 40 10 50 |

Из таблицы 1 видно, что большое количество НЧ попадает в воздух, что представляется весьма опасным для биосферы; непосредственное попадание в окружающую среду не так велико, но наиболее опасно и, что самое важное, имеет тенденцию к увеличению вследствие роста производства и потребления НМ.

Производство НМ

Потенциально опасным местом, в котором концентрация НМ может достигать критических значений, является производство НМ. Таких площадок десятки тысяч во всем мире. С точки зрения производительности производство можно разделить на промышленное производство (от 1 тонны в год), опытно-промышленное производство (более десятков килограмм) и лабораторное получение НМ (в небольших количествах, обычно менее килограмма).

Рынок УНМ. В настоящее время в мире производятся тысячи тонн УНМ. В основном, это фуллерены (~1500 т/год), ОУНТ и МУНТ (> 500 т/год). Несмотря на достаточно молодой рынок УНТ, среди производителей уже появились свои лидеры: Nanocyl S.A. (Бельгия); Nanoledge, CNRI, Arkema (Франция); Thomas Swan, Dynamics Lab. (Великобритания); Bayer (Германия); Carbon Nanotechnologies, Hyperion Catalysis, Ebay, NanoLab, CarboLex, MER, Tailored Materials Corp., SweNT (США); Shenzhen Nanotech Port Co. (Китай); Mitsui, Showa Denko (Япония); Raymor Industries Inc. (Канада) и др. (Годымчук и др., 2012).

Азиатский регион занимает лидирующие позиции по выпуску УНТ, на долю США и Европы приходилось 26 % и 10 % соответственно (Рис. 4).

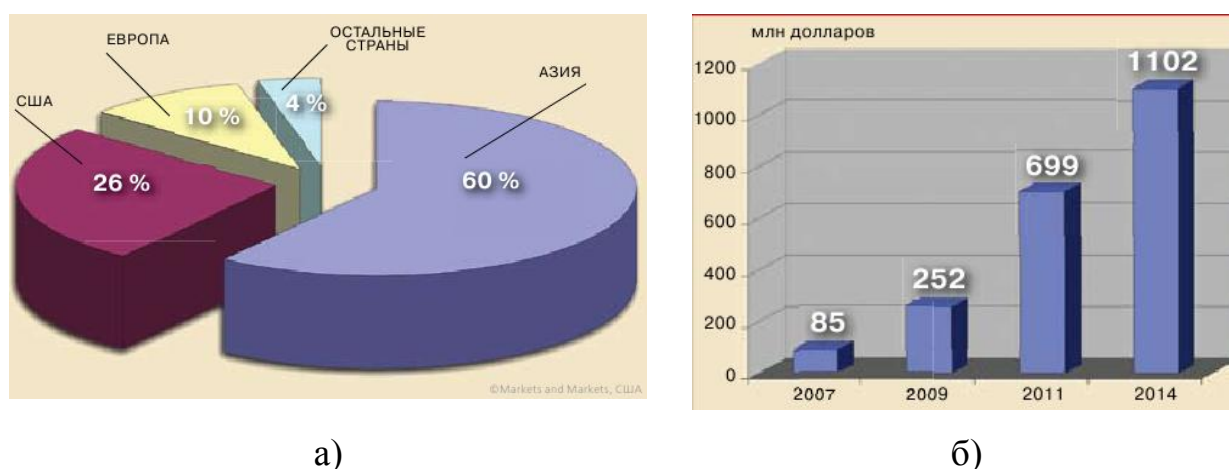


Рисунок 4 - Производство УНТ: а) в мире; б) объем рынка в 2007–2014 гг. (по Годымчук и др., 2012)

Увеличение спроса на УНТ подталкивает производителей к оперативному наращиванию мощностей. Компания Bayer, располагая в Германии заводом по выпуску УНТ, заявляла о намерении в ближайшие несколько лет довести суммарную мощность по УНТ до 3 тыс. т/год. Компания CNano (США) завершила строительство крупного завода в Китае мощностью 500 т/год. В планах компании строительство еще одного завода аналогичной мощности. Об увеличении суммарных мощностей до 550 т/год заявила и Arkema, первый завод компании был построен во Франции и имел мощность по CNT всего 20 т/год. Японская Showa Denko намерена нарастить объемы до 650 т/год, а бельгийская Nanosyl – до 150 т/год (Годымчук и др., 2012).

Но рынок УНМ постоянно растет и развивается (Ким, 2009). Поэтому при производстве НМ остро стоит вопрос о воздействии НЧ в определённых местах рабочей зоны (Oberdörster et al., 2005). Это связано с тем, что на каждой стадии производства происходит образование порошковых НМ, способных поступить в окружающую среду.

Методы получения УНМ. Фуллерены получают различными методами, среди которых распространены: дуговой метод, производство фуллеренов в пламени, при лазерном нагреве, при испарении графита сфокусированным солнечным излучением, а также химический способ синтеза фуллеренов (Богданов и др., 2000).

Наиболее эффективным способом получения фуллеренов является термическое распыление графитового электрода в плазме дугового разряда, горящего в атмосфере гелия. Между двумя графитовыми электродами зажигается электрическая дуга, в которой испаряется анод. На стенках реактора осаждаются сажа, содержащая от 1 до 40 % (в зависимости от геометрических и технологических параметров) фуллеренов. Для экстракции фуллеренов из фуллеренсодержащей сажи, сепарации и очистки используются жидкостная экстракция и колоночная хроматография. Производительность составляет не более 10 % от веса исходной графитовой

сажи, при этом в конечном продукте соотношение $C_{60}:C_{70}$ соответствует 90:10. К настоящему времени это единственный способ получения фуллеренов поставляемых на рынок (Withers et al., 1997). К недостаткам метода относятся сложность выделения, очистки и разделения фуллеренов различных масс из углеродной сажи, низкий выход фуллеренов, и как следствие их высокая стоимость.

Наиболее распространенными методами синтеза нанотрубок являются электродуговой разряд, лазерная абляция¹ и химическое осаждение из газовой фазы.

При использовании электродугового разряда происходит интенсивное термическое испарение анода, при этом на торцевой поверхности катода образуется осадок (~ 90 % массы анода), в котором формируются нанотрубки углерода (<http://www.cleandex.ru/articles/2007/12/10/nanotubes-carbon>), которые имеют длину порядка 40 мкм. Их пучки можно обнаружить, рассматривая осадок на катоде даже невооруженным глазом. Пространство между пучками нанотрубок заполнено смесью неупорядоченных НЧ и одиночных нанотрубок. Содержание нанотрубок в углеродном осадке может приближаться к 60 % (Ким, 2009). При этом длина получаемых одностенных нанотрубок достигает нескольких микрометров при малом диаметре (1–5 нм).

К недостаткам метода относятся технологические трудности, связанные с осуществлением многостадийной очистки продукта от сажевых включений и других примесей. Выход ОУНТ не превышает 20–40 %. Громадное количество управляющих параметров (напряжение, сила и плотность тока, температура плазмы, общее давление в системе, свойства и скорость подачи инертного газа, размеры реакционной камеры, длительность синтеза, наличие и геометрия охлаждающих устройств, природа и чистота материала электродов, соотношение их геометрических размеров, а также ряд параметров, которым трудно дать количественную оценку, например скорость охлаждения углеродных паров и др.) значительно усложняет регулирование

¹Лазерная абляция – метод удаления вещества с поверхности лазерным импульсом.

процесса, аппаратное оформление установок синтеза и ставит препятствие для их воспроизводства в масштабах промышленного применения. Это также мешает моделированию дугового синтеза УНТ.

При лазерной абляции происходит испарение графитовой мишени в высокотемпературном реакторе с последующей конденсацией, при этом выход продукта достигает 70 %. С помощью этого метода получают преимущественно ОУНТ с контролируемым диаметром. Несмотря на высокую стоимость получаемого материала (Ким, 2009), этот метод может выйти на промышленный уровень, поэтому важно при его реализации исключить риск попадания нанотрубок в атмосферу рабочей зоны. Последнее возможно при полной автоматизации процессов и исключения персонала из процессов упаковки материала.

Химическое осаждение из газовой фазы происходит на подложке со слоем катализатора из частиц металла (чаще всего никеля, кобальта, железа или их смеси). Для инициации роста нанотрубок в реактор вводят два типа газов: технологический газ (например, аммиак, азот, водород и т.д.) и углеродосодержащий газ (ацитилен, этилен, этанол, метан и т.д.). Нанотрубки начинают расти на участках металлических катализаторов. Этот метод наиболее перспективен в промышленных масштабах благодаря меньшей цене на единицу продукции, относительной простоте и контролируемости роста нанотрубок с помощью катализатора. Данную технологию получения УНТ применяют такие компании, как Bayer, Arkema, Nanocyl, Nanothinx, NanoLab, Hyperion Catalysis, Mitsui, Showa Denko и др. (Годымчук и др., 2012).

Детальный анализ метода химического осаждения в газовой фазе, показал наличие как минимум 15 ароматических углеводородов, в том числе были обнаружены 4 токсичных полициклических углеродных соединения. Наиболее вредным в составе побочных продуктов производства был признан полициклический бенз(а)пирен, широко известный канцероген, действующий на организм человека. Другие составляющие представляют собой прямую

угрозу озоновому слою планеты
(<http://www.cleandex.ru/articles/2007/12/10/nanotubes-carbon>).

Несколько российских компаний уже приступили к производству УНТ. Так, НТЦ «ГраНаТ» (Московская область) располагает разработанной собственными силами пилотной установкой синтеза УНМ методом химического осаждения производительностью до 200 г/ч (Ким, 2009). ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец» им. Н.С. Артемова» с 2005 г. развивает производство УНМ «Таунит» – многослойные углеродные нанотрубки, которые получают методом газофазного химического осаждения на металлическом катализаторе. Суммарная мощность реакторов по производству УНТ российских производителей достигает 10 т/год (Ткачев, Золотухин, 2007).

1.2.2 Миграция в окружающей среде и экологические эффекты наночастиц

Виды взаимодействия НМ с окружающей средой

Если рассматривать природные среды, как объекты, в которых может быть и газовая, и жидкая, и твердая дисперсионные среды, то возможны следующие пути поступления НЧ в окружающую среду.

1) *Образование и коагуляция золей.* При попадании в воздушную среду НЧ взаимодействуют с ней с образованием золей. В дальнейшем золи могут коагулировать с различными скоростями в зависимости от природы компонентов и условий. Например, в процессе утилизации отходов сжиганием образуются очень устойчивые во времени аэрозоли на основе УНТ (Murr, Garza, 2008).

Известно, что высокодисперсные материалы могут временно стабилизироваться механическим, ультразвуковым воздействием, а также обработкой ионными пучками и добавлением химических стабилизаторов. При этом в естественных условиях эти процессы обычно имеют случайный характер. Экспериментальные данные показывают, что действие

органических стабилизаторов на коллоидную систему сильно зависит от концентрации и времени, так что небольшое количество стабилизатора может вызвать деагломерацию, но через некоторое время опять произойдёт коагуляция. Например, НЧ FeO, покрытые додецилсульфатом натрия, очень стабильны в почве только в течение 14 дней без изменения кривой распределения по размерам частиц (Lyon et al., 2007).

2) *Растворение.* Растворение НЧ происходит с образованием коллоидных и истинных растворов. В первом случае объём частиц остаётся неизменным, может меняться состав их поверхностей. Во втором случае материал НЧ переходит в раствор в ионном или молекулярном виде. Оболочки, в которые заключаются НЧ, могут быть жирорастворимыми (например, наноконтейнеры для доставки лекарств по кровяному руслу в больной орган или систему) или водорастворимыми (например, микрокапсулированные НЧ для очистки воды).

С другой стороны, есть примеры частичного растворения металлических нанопорошков в водных неорганических растворах с образованием трудно-растворимых осадков другого состава, то есть возможно превращение в растворе твердых реагентов в твёрдые продукты, что трудно реализуемо в случае макроматериалов. Этот эффект (существенное увеличение степени химического превращения НЧ) объясняется увеличением в НЧ скорости диффузии реагентов через слой твёрдых продуктов вследствие малой его толщины. Например, степень растворения пассивированных электровзрывных нанопорошков меди может достигать 7-15 % по массе, при этом скорость растворения имеет максимальное значение в первые минуты контакта с раствором (Godymchuk et al., 2010). Неполное растворение объясняется наличием достаточно крупных частиц.

Возможно также растворение НМ в присутствии органических веществ, которые играют роль хелатных² лигандов, что приводит к

²Хелатами называют комплексные соединения, внутренняя сфера которых состоит из циклических

загрязнению окружающей среды соединениями металлов. Например, есть данные по растворению НЧ FeO в присутствии ацетатов и солей молочной кислоты (Neely et al., 2007.).

3) *Сорбция (поглощение)*. НМ могут эффективно поглощать вещества из окружающей среды и поглощаться другими компонентами экологической системы. Так, НЧ Fe₂O₃ диаметром 7 нм адсорбируют Cu²⁺-ионы лучше, чем те же частицы с линейным размером 25 нм (Madden et al., 2006). НМ также могут поглощаться поверхностью почв и грунтов. Сорбция почвами происходит по механизмам, подобным коагуляции НЧ, которая состоит в проникновении самих НЧ в почву и их фиксации на частицах почвы.

4) *Разложение*. Многие неорганические НМ в окисленной форме (например, Al₂O₃) достаточно стабильны в окружающей среде (атмосфере, гидросфере) и практически не участвуют в химических реакциях. Органические НМ менее устойчивы и могут подвергаться разложению при воздействии различных факторов окружающей среды (свет, температура, окислители). Например, фуллерены склонны к медленному окислению в растворах, особенно при воздействии озона вместо кислорода воздуха (Chibante, Neumann, 1993), что может быть использовано в процессах утилизации органических веществ сжиганием, когда они получают в больших количествах, а также при очистке воды и воздуха. УНТ, как и сажа, очень стойки к разложению в почвах, что может быть использовано при вторичной переработке отходов, содержащих УНМ (Tong et al., 2007).

Схема миграции НЧ в окружающей среде

Поступая из разных источников в окружающую среду, НЧ, благодаря малому размеру, способны проникать в самые разные области нашего мира. Схема миграции НЧ представлена на рисунке 5; она показывает их перемещение в средах (атмосфера, гидросфера и литосфера), а также миграцию в различные биологические объекты (человек и наземные обитатели, гидробионты, почва и отложения и т.д.).

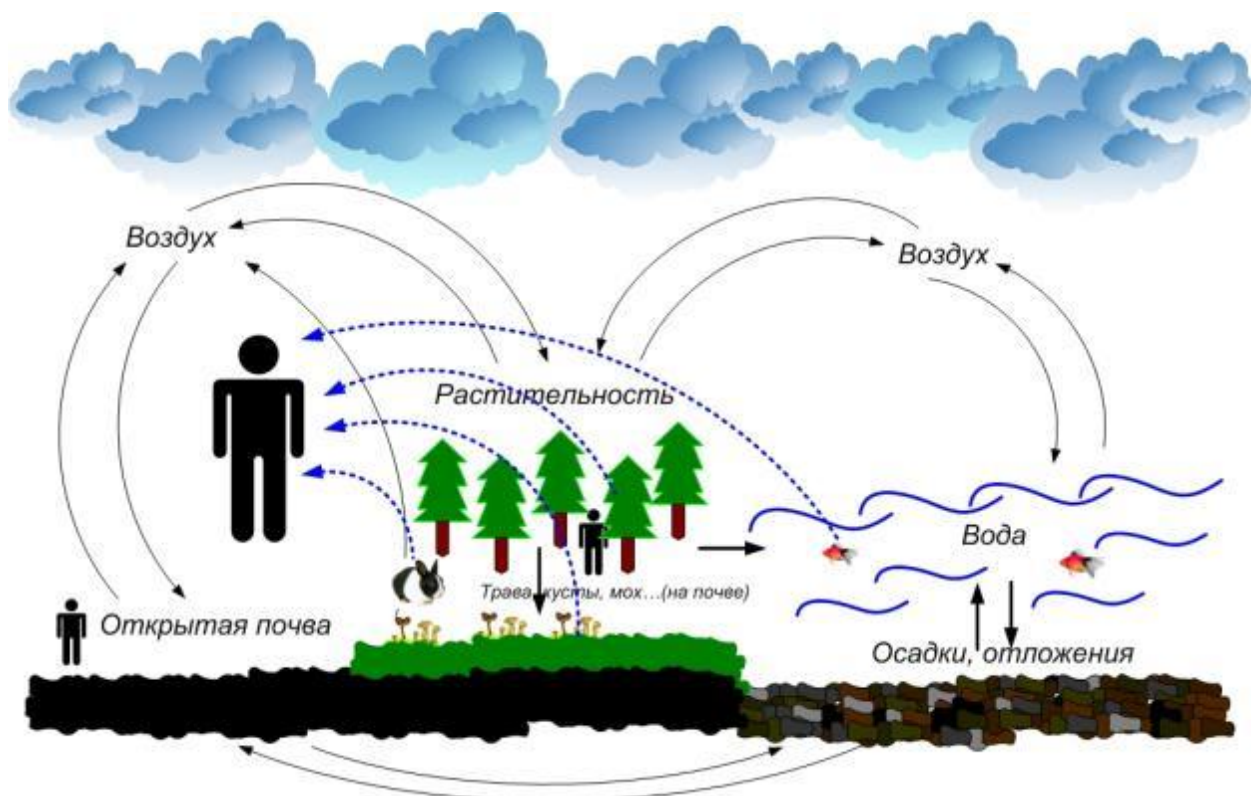


Рисунок 5 – Возможное перемещение НЧ в окружающей среде (по Годымчук и др., 2012)

При попадании НЧ в воздух могут образовываться устойчивые во времени аэрозоли, которые с помощью различных механизмов могут попадать в наземные биологические объекты через дыхание, кожу и пищеварительный тракт. Посредством сорбции НЧ из аэрозолей поглощаются растениями, активно проникая в растительный мир, являющийся источником пищи практически для всех биообъектов (Рис. 5). Диспергированные НЧ в воздухе могут абсорбироваться водой различных объектов (озёра, реки и т.п.), с осадками они могут попадать в почву и грунты (Годымчук и др., 2012).

При попадании в воду, используемую для питьевых нужд и в медицине, НЧ могут также проникать в организм человека через пищеварительный тракт. К сожалению, исследований, доказывающих данный маршрут, к настоящему времени практически не проводилось.

Попадание НЧ в почвы может происходить из атмосферы (осаждение, адсорбция, адгезия), гидросферы (растворение – осаждение, адсорбция, адгезия) и из биологических объектов (при их жизнедеятельности и разложении). При попадании в почвы НЧ могут нарушать ее микробиологический состав, оказывая опосредованно влияние на плодородность (DaSilva et al., 2006). Из почвы они могут проникать в бентос, и далее по пищевой цепочке в водоросли и более сложные организмы животного мира.

НЧ, содержащиеся в воздухе, могут оседать на листьях и других наземных частях растений, а НЧ из гидросферы и литосферы будут взаимодействовать с частями растений, находящимися соответственно в этих средах. На примере железных частиц в воздухе было показано проникновение частиц внутрь растения через поры (Corredor et al., 2009). Накопление НЧ на поверхности растений может влиять на фотосинтез и газообмен, а, следовательно, на его жизнедеятельность.

Исследователи ожидают, что растения с большим индексом листовой поверхности (ИЛП) потенциально могут быть более активными участниками миграционной карты НЧ, особенно это касается тех растений, которые участвуют в трофических цепях. Например, ИЛП для ели (*Picea Abies*) составляет 5,3-7,9, а общая площадь одного дерева достигает 750 м². Поэтому лес может являться очень эффективным звеном миграции НЧ, содержащихся в атмосфере, в то же время и кустарники с ИЛП 0,27-3,3 могут активно участвовать в миграции НЧ при их большом количестве (Adams et al., 2006).

Миграция НЧ через трофические цепи

После попадания в гидросферу из воздуха и в составе сточных вод НЧ образуют суспензии, которые, в первую очередь, поглощаются планктоном или беспозвоночными, живущими на дне среди отложений. Являясь своеобразными «фильтраторами» веществ, токсичных для крупных организмов, а также источником питания для рыб, водные беспозвоночные представляют собой одну из самых важных групп организмов, подвергаемых

экотоксикологическому воздействию нано- и микроразмерных материалов (Киселев, 2002).

Наиболее известные и, следовательно, традиционно используемые для экотоксикологических испытаний организмы представлены отрядом дафний (*Daphnia magna* и ее подвидах), ракообразных (*Amphiascus tenuiremis*), мидий (*Elliption complanata*), а также кольчатых червей (*Lumbriculus variegates*). Эти обитатели являются потребителями биологических отложений, органических и растительных веществ, участвуя в процессах разложения органики и рециркуляции пищи. Беспозвоночные организмы являются потребителями всех веществ, включая токсичные, содержащихся в водной системе. Такие беспозвоночные, как мидии, пропускают через себя большое количество воды, что играет очень важную роль в балансе водных экосистем. Водные беспозвоночные играют важнейшую роль в трофических цепях, существующих на Земле, а также они характеризуются высокой чувствительностью к изменениям в окружающей среде. Именно поэтому данные гидробионты считаются приемлемыми и обязательными объектами для экспериментального определения экотоксикологических параметров НМ (Годымчук и др., 2012).

Упрощенно, трофическая цепь, по которой НЧ могут мигрировать в окружающей среде, представлена на рисунке 6.

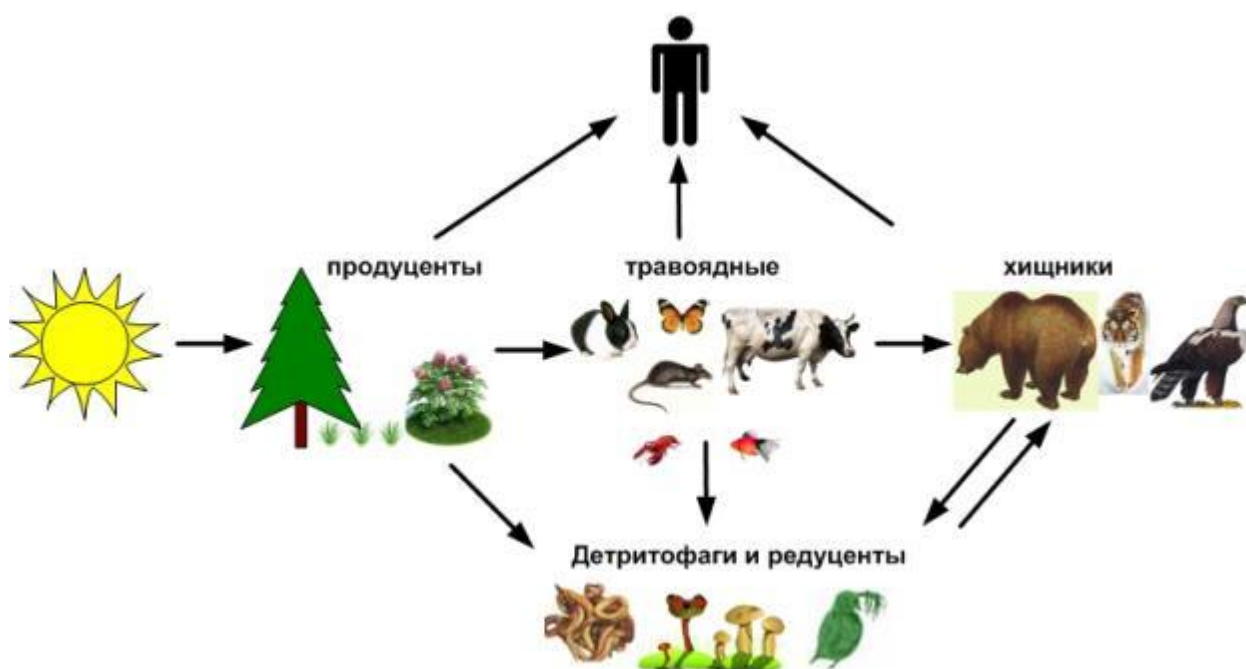


Рисунок 6 - Упрощенная схема трофических связей между организмами окружающей среды: продуценты на суше – леса, луга, продуценты в воде – водоросли; к растительным относят многих насекомых, птиц и зверей на суше, моллюсков и ракообразных в воде, а также паразитов растений; редуценты – это сапрофиты (бактерии и грибы), питающиеся органическими остатками мёртвых растений и животных, детритофаги – животные (черви), ускоряющие процесс разложения остатков (по Turgittiplakorn et al., 2004)

Следовательно, любой организм, представляющий собой звено трофических цепей, может подвергаться риску воздействия НМ. Однако, очевидно, что бактерии, водоросли, бентос и рыбы наиболее чувствительны к биологическому действию НМ (фуллерены, полимеры, Fe_2O_3 , TiO_2 , SiO_2), которые воздействуют особенно активно на бактерии (Da Silva et al., 2006; Adams et al., 2006; Turgittiplakorn et al., 2004; Neal, 2008). Безусловно, высокая бактерицидная (противомикробная) активность НМ может вызвать

дисфункцию бактерий, участвующих в экологическом балансе разных систем (Hardman, 2006).

Некоторые производимые НЧ, такие как квантовые точки, могут попадать и очень долгое время находиться в клетках, в результате чего такие НМ могут эффективно передаваться по пищевым цепям (Geller, Müller, 1981). Высокая способность проникать через мембраны УНМ обеспечивает значительное их накопление в организме. При этом судьба НЧ в организме зависит от их физико-химических свойств и свойств внутренней среды самого организма.

Таким образом, имеющиеся данные демонстрируют зависимость миграционной способности НЧ от физико-химических свойств среды и самих частиц, при этом предполагается поступление НМ во все области экосистемы: атмосфера, биосфера, литосфера, гидросфера. В силу того, что влияние всех этих факторов на миграционные способности НЧ не изучены, закономерности влияния НМ на жизнедеятельность организмов трудно установить.

Механизмы взаимодействия НМ, биологических объектов и окружающей среды

Действие на биологические структуры НМ в силу особенностей их свойств будет отличаться от действия химических веществ (молекул, ионов, кристаллов), которые рассматриваются в традиционной токсикологии.

Из разных сред обитания животных и растений НЧ проникают внутрь или закрепляются на поверхности животных организмов и растений следующими способами.

1. *Поглощение с пищей* – самый простой и эффективный способ проникновения НЧ, относящийся ко всем организмам, добывающим пищу из почвы, воды и других биологических объектов (растений и животных). Такой способ был хорошо продемонстрирован на самых чувствительных участниках трофических цепей – беспозвоночных, большинство которых обитает в водной среде. Дафнии, как и другие беспозвоночные, «фильтруют»

большое количество воды через специальные приспособления (наружные гребешки на их «конечностях»), при этом с водой в дафнии могут проникать частицы с размером менее 40 мкм (Zhu et al., 2009), что существенно превышает наноразмеры.

НЧ или их агломераты способны проникать в пищеварительный тракт даже беспозвоночных (Рис. 7). При этом доказано, что агломераты НЧ эффективнее задерживаются во внутренностях беспозвоночных в отличие от одиночных НЧ.

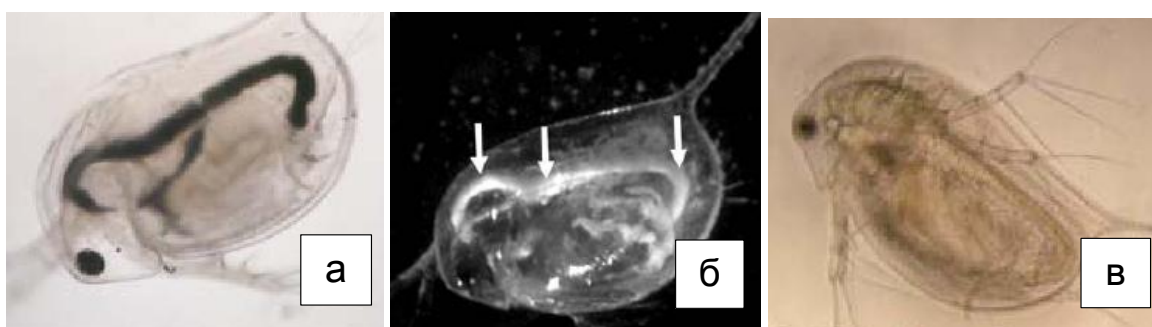


Рисунок 7 - Попадание и накопление НЧ в организме *Daphnia magna* в пищеварительном тракте: а) МУНТ (диаметр 10-20 нм, длина 5-15 мкм) (Oberdorster et al., 2006), б) НЧ TiO₂ (размер 20-100 нм) (Adams et al., 2006), в) контрольная дафния с пустым пищеварительным трактом (Oberdorster et al., 2006)

2. *Адгезия на поверхности* характерна для животных с наружным скелетом и растений. Так, влияние адгезии НМ было исследовано на примере беспозвоночных *Daphnia magna* и *Acartia tonsa* в водных суспензиях НЧ TiO₂ и C₆₀ (Рис. 8).

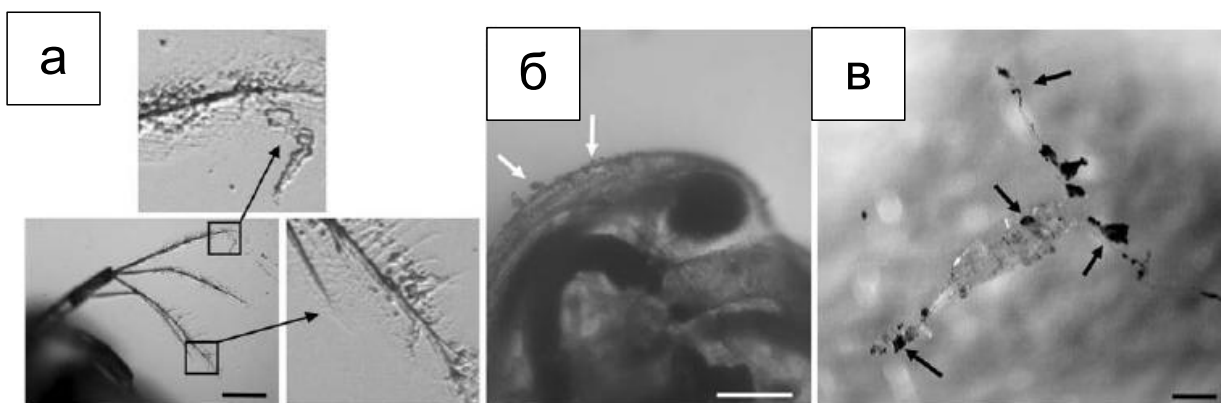


Рисунок 8 - Адгезия: а) НЧ TiO_2 из водного раствора на усиках и б) на наружном скелете *Daphnia magna*, в) НЧ C_{60} на морских паразитах семейства ракообразных *Acartia tonsa* (Moore, 2006)

Было, в частности показано, что адгезия агломератов НЧ ограничивает мобильность самих организмов и влияет на поведение испытуемых: особи сталкиваются со стеклянными стенками посуды, плавают кругами на поверхности воды, увеличивается или уменьшается количество их прыжков, меняется частота ударов сердца, снижается количество потомства, задерживается линька панциря. Причины для такого поведения не совсем ясны, но ряд авторов связывают это с адгезией НЧ (Moore, 2006).

3. *Эндоцитоз клетками растений.* В противоположность животным, у большинства растений, водорослей и грибов первичным барьером для попадания НЧ внутрь служат стенки самих клеток. Большинство компонентов клеток – это углеводороды, образующие комплексы, и протеины. Функциональные группы (карбоксилаты, фосфаты, гидроксилы, амино-группа, сульфогидрил, имидазол) в биомолекулах являются активными центрами. Стенки клеток растений и водорослей в основном состоят из целлюлозы, а у грибов – из хитина. Водоросли обычно имеют гликопротеины и полисахариды в стенках клеток. Однако, кремниевые водоросли представляют специфический случай – стенки их клеток состоят из гидрированного диоксида кремния. Стенки полупроницаемы и позволяют мигрировать маленьким молекулам, ограничивая прохождение больших

молекул. Диаметр пор в стенках клетки составляет 5-20 нм, что и определяет их способность к фракционированию частиц. Поэтому только НЧ и их агрегаты, размер которых меньше крупных пор, предположительно могут проникать внутрь клеток и достигать плазматической мембраны (клеточной оболочки). Пропускная способность клеток может меняться, т.к. могут образовываться новые поры под действием НЧ, разрушающих стенки клетки.

Потенциальный путь проникновения НЧ через двойной липидный слой мембраны клеток (Jia et al., 2005) можно представить следующим образом. Во время эндоцитоза, плазматическая мембрана формирует дырочную структуру, окружающую НЧ, и затягивает их в клетку. НЧ также могут проникать в клетку, используя белки и ионы в качестве транспортеров. Как только НЧ проникают в клетку, они взаимодействуют с органеллами (например, эндоплазматическим ретикуломом, комплексом Гольджи и эндолизосомной системой), втягиваются в процессы метаболизма, а также, возможно, приводят к образованию свободных радикалов.

Например, набухание эндоплазматического ретикула и вакуолярные нарушения были отмечены в макрофагах. Ядра макрофагов могут подвергаться дегенерации, гипертрофии и уменьшению плотности при высоком содержании МУНТ (Handy et al., 2008).

Биодоступность и её механизмы

Известно, что липофильные соединения, в отличие от гидрофильных, способны к большей диффузии через клеточные мембраны. Это особенно свойственно малым органическим молекулам липофильных соединений. Для них характерна высокая биологическая доступность.

Традиционно понятие «биодоступность» применяют по отношению к пероральным (поступающим через пищеварительный тракт) лекарственным препаратам. Если препарат назначается внутрь, то в кровоток поступает лишь некоторая часть дозы. Эта часть (в процентах) называется биодоступностью. Другими словами, биодоступность обеспечивается проникновением частиц вещества через мембраны. В случае катионов металлов биологическое

воздействие происходит через диффузию образующихся комплексов металл-протеинов.

Что касается НМ, то возможность их проникновения с помощью липофильного механизма в клетку не является бесспорной. Например, для обитателей водной среды (рыбы, беспозвоночные) первым шагом является захват НЧ слизистой оболочкой кожи, жабр и кишечным эпителием (Kashiwada, 2006). Более того, ученые полагают, что далее НМ транспортируются не с помощью диффузии через клеточные мембраны, а посредством везикулярного транспорта (фагоцитоз, пиноцитоз) (Jia et al., 2005).

В этом случае некоторые беспозвоночные (например, двухстворчатые моллюски), активно использующие везикулярный транспорт через желудочно-кишечный тракт, могут быть особенно восприимчивы к воздействию НМ. Рыбы более способны к эндоцитозу в кишечнике, чем позвоночные животные. Вероятно также, что некоторые НМ могут преодолевать гематоэнцефалический барьер (Roberts et al., 2007.). Предполагают, что этот тип переноса возникает из-за параклеточных (межклеточных) миграций через стенки кровеносных сосудов.

Понятие «биологическая доступность» по отношению к НМ можно определить, как их способность проникать через клеточные мембраны.

Направления изучения механизмов транспорта НЧ в настоящее время уже сформировались, но пока не получено конкретных результатов и закономерностей (Годымчук и др., 2012).

Удаление НЧ из объектов окружающей среды

В рамках экотоксикологии процессы выведения НМ касаются как НЧ природного происхождения, находящихся в окружающей среде в течение миллионов лет (вулканическая пыль), так и НЧ, целенаправленно производимых человеком (фуллерены, УНТ, металлические НЧ и т.д.). В литературе мало данных, доказывающих или опровергающих выведение НМ из биологических объектов (беспозвоночных, позвоночных, растений). Тем

не менее, существуют некоторые предположения, основанные на проведении немногочисленных исследований.

Важно отметить, что практически для всех видов НМ коагуляция, адсорбция, адгезия, эндоцитоз в клетках биообъектов протекает настолько активно, что выведение их из организма кажется невозможным. Однако, есть сведения, полученные с использованием дафний *Daphnia magna* об удалении НМ фуллерена C₆₀ естественным путем через 48 часов (Moore, 2006) и выведении ОУНТ, покрытых липидным слоем (Rosenkranz et al., 2007).

В то же время остальные НЧ (ZnO, Al₂O₃, TiO₂, МУНТ, полистерен) не выводятся из организма дафний, а их аккумуляция приводит к развитию токсических эффектов (Blaser et al., 2008; Oberdorster et al., 2006).

Несмотря на то, что до сих пор нет полных данных о том, какие процессы сопровождают проникновение НЧ или способствуют ему, можно предположить следующие условия и причины, важные для их поступления в экосистемы или организмы:

- 1) образование устойчивых аэрозолей (дыма, пыли, лиозолей и суспензий) – важные начальные условия проникновения НЧ;
- 2) коллоидно-химические свойства НЧ (заряд поверхностей и образование двойного электрического слоя, тонкие плёнки на поверхности, сильная зависимость устойчивости и других свойств от примесей) – факторы, способствующие возможности и кинетике проникновения;
- 3) способность миграции через поры и мембраны в живых объектах, обусловленная как с коллоидно-химическими свойствами, так и с размерами пор и частиц;
- 4) повышенная растворимость и реакционная способность, связанная с высокой удельной поверхностью НМ, приводящая к реализации ионно-молекулярных форм проникновения.

Таким образом, актуальной задачей является создание и исследование экспериментальных моделей перехода НЧ в природные среды в составе дисперсных систем для последующей оценки их экотоксичности.

1.2.3 Влияние наночастиц на растительные организмы

Довольно мало исследований посвящено проблеме фитотоксичности промышленных НМ, т.к. большинство работ сконцентрировано на млекопитающих или клеточных культурах. В то же время, этот вопрос является важным, поскольку НЧ, попадая, например, в сточные воды, могут накапливаться в их отстое и попадать на сельскохозяйственные поля (Lee et al., 2010), в дальнейшем включаясь в пищевые цепи, что может нанести вред окружающей среде и здоровью человека. В имеющихся работах в основном рассматриваются эффекты наиболее распространенных промышленно производимых НМ, таких как НЧ металлов и их оксидов и УНМ.

НЧ металлов и их оксидов

Значительная часть исследователей указывает на токсичность металлов и их оксидов для растений. В работе Янга и Уоттса (Yang, Watts, 2005) изучены эффекты нано оксидов алюминия (Al_2O_3), кремния (SiO_2), железа (Fe_3O_4) и цинка (ZnO) в концентрациях 400, 2000 и 4000 мг/л на развитие *Arabidopsis thaliana* при добавлении в инкубационную среду. Показано, НЧ ZnO наиболее фитотоксичны, за ними следуют частицы Fe_3O_4 , SiO_2 и Al_2O_3 , которые не проявляют токсических свойств. Установлено, что уменьшение размера частиц ZnO ведет к повышению токсичности.

В исследовании авторов Лин и Ксин (Lin, Xing, 2007), указывается на важность поверхностных свойств НЧ в фитотоксикологии. На растениях *Zea mays*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Brassica oleracea* и *Daucus carota* показано, что токсический эффект НЧ алюминия, проявляющийся в подавлении роста корня, уменьшается с нанесением на поверхность частиц молекулярных слоев трициклического ароматического углеводорода фенантрена (phenanthrene).

В работе Райковой с соавторами (Райкова и др., 2006) исследованы эффекты водных суспензий пяти типов НЧ – МУНТ, алюминия (Al), оксида алюминия (Al_2O_3), цинка (Zn), и оксида цинка (ZnO) на прорастание семян и росте корней редьки (*Raphanus sativus*), рапса (*Brassica napus*), плевела

(*Lolium multiflorum*), салата (*Lactuca sativa*), кукурузы (*Zea mays*) и огурца (*Cucumis sativus*). Показано, что наноксид цинка и наноксид алюминия в концентрации 2000 мг/л ингибировали прорастание кукурузы. Установлено значительное подавление прорастания плевела НЧ цинка в концентрации 2000 мг/л., в то время как МУНТ в той же концентрации не вызывали негативных эффектов. В зависимости от вида растений, НЧ алюминия могли как позитивно, так и негативно влиять на удлинение корня.

В исследовании Лю с соавторами (Lu et al., 2002) продемонстрировано, что НЧ меди, введенной в агарозную среду для проращивания растений, оказывали подавляющий эффект на процессы вегетации фасоли золотистой (*Phaseolus radiatus*) и пшеницы (*Triticum aestivum*) в концентрациях 335 и 570 мг/л соответственно. С помощью методов электронной микроскопии и энергодисперсионной спектроскопии было показано накопление НЧ меди в тканях растений.

Оценка экологической токсичности НЧ железа в концентрации 0-5000 мг/л и трех типов НЧ серебра, размером от 1 до 20 нм в концентрации 0-100 мг/л на прорастание семян на растениях плевела (*Lolium multiflorum*), ячменя (*Hordeum vulgare*) и льна (*Linum usitatissimum*) проведена в работе Эл-Темсаха и Джонера (El-Temsah, Joner, 2012). Проращивание проводилось на почве и на песке. Оказалось, что подавление вегетации начиналось с концентраций 250 мг/л для наножелеза и 10 мг/л для наносеребра. Тип почвы влиял на результаты незначительно. Более чувствительным, чем всхожесть семян, показателем токсичности оказался процесс удлинения проростков. Полное подавление прорастания наблюдалось при 1000-2000 мг/л для железа. Для серебра полное подавление прорастания достигнуто не было. Отмечается, что наименее устойчивым к действию НЧ железа оказался лен, затем плевел, а затем ячмень. Размер НЧ серебра не оказывал влияния на их токсичность. Авторы исследования не рекомендуют использовать всхожесть семян для оценки влияния наносеребра.

В то же время, есть свидетельства позитивного эффекта, оказываемого НЧ на растения. Среди положительных эффектов отмечается ускоренное прорастание и рост сои (*Glycine max*) под действием смеси наноразмерных частиц диоксида кремния ($n\text{SiO}_2$) и диоксида титана ($n\text{TiO}_2$) при низких концентрациях; при этом наблюдались увеличение активности нитраторедуктазы, увеличение способности поглощать воду и удобрения, стимуляция антиоксидантной системы (Hong et al., 2005). Добавка от 2,5 до 40 г/кг почвы НЧ оксида титана ($n\text{TiO}_2$) усилило рост шпината (*Spinacia oleracea*), вероятно защищая хлоропласты от старения во время долгого освещения. Точно также НЧ диоксида кремния ($n\text{SiO}_2$) увеличивали рост лиственницы (*Larix olgensis*) с ростом концентрации до 500 мг/л (Lin et al., 2004).

В работах отечественных ученых достаточно широко описаны позитивные эффекты нанопорошков металлов на сельскохозяйственные растения (Горбачев, 2001; Каплуненко и др., 2008; Коваленко, Фолманис, 2006; Попов, Филиппов, 2010; Райкова и др., 2003; Сармосова, 2002)

Среди результатов этих исследований необходимо отметить следующие.

В исследовании Назаровой и Полищук (Назарова, Полищук, 2011) предполагается, что нанопорошки металлов своим энергетическим воздействием стимулируют процессы адаптации и самоорганизации биологических систем к внешним условиям. НЧ, в какой-то мере, снижают отрицательное влияние неблагоприятных факторов окружающей среды. Так в условиях жаркого, засушливого 2010 года, когда абсолютная величина урожайности зеленой массы изучаемых растений кукурузы (*Zea mays*) и подсолнечника (*Helianthus annuus*) была низкой, использование нанометаллов для предпосевной обработки семян было самым эффективным, урожайность повышалась на 20-30%. В условиях избыточной влажности (2002 г.), когда стимуляция вегетативного роста, как правило, замедляет развитие и созревание растений и усиливает негативное влияние погоды,

стимулирующий эффект нанометаллов совместил повышение мощности растений с увеличением семенной продуктивности и качества семян вики (*Vicia sativa*) (Павлов, 2002). Особенности химического взаимодействия НЧ с жидкой средой являются одним из определяющих факторов в стимулировании развития растений, что дает возможность применения нанометаллов в качестве микроудобрений и стимуляторов роста, обладающих пролонгированным действием. Предполагается, что нанокристаллические металлы обладают большими возможностями в минеральном питании и энергетическом воздействии. За счёт некомпенсированных связей они легко образуют комплексные соединения с органическими веществами. В результате чего синтезируются и активируются различные ферменты, влияющие на углеводный и азотный обмены, синтез аминокислот, реакции фотосинтеза и дыхания клеток (Фолманис, Коваленко, 1999). Утверждается, что наноструктурированные металлы с размерами 20-50 нм, в малых дозах 0,01 – 0,08 г на гектарную норму высева семян и 3 г на тонну комбикорма экологически безопасны (Чурилов и др. 2010). Следует отметить, что изучение физико-химических, биологических и токсикологических свойств нанометаллов позволяет получить научно обоснованные и объективные результаты экологических последствий их использования. Многими авторами была показана необходимость выработки условий и дозы применения, необходимых для оценки воздействия НЧ на здоровье человека и окружающую среду.

Предпосевная обработка семян вики (*Vicia sativa*) ультрадисперсными порошками металлов железа, кобальта и меди в дозах до 0,05 г на гектарную норму высева не оказывает достоверного влияния на изменение данных металлов в их стеблях и листьях (Амплеева, и др. 2000). Предпосевная обработка семян ультрадисперсными порошками металлов железа, кобальта и меди в дозах 0,01-0,08 г показала незначительное изменение содержания в растениях тех микроэлементов, которые использовались для обработки семян. Абсолютное содержание железа в растениях колебалось в диапазоне

51,5 – 53,2 мг/кг сухого вещества в опытных вариантах (после обработки нанометаллами), тогда как в контроле данный показатель составлял 58,5 мг/кг сухого вещества. Еще меньшим диапазон колебаний был в содержании меди и кобальта в опытных растениях, по меди он составлял 8,9 – 7,4 и кобальту 0,19 – 0,12 мг/кг сухого вещества, что не позволяет выявить каких-либо закономерностей по опытным вариантам.

Однако после обработки семян кукурузы (*Zea mays*) перед посадкой нанопорошками железа характер аккумуляции химических элементов в зелёной массе и семенах различался в процессе онтогенеза (Жеглова и др., 2010). На разных фазах развития растений в их корнях, стеблях и листьях происходило уменьшение концентрации одних элементов при увеличении других. Независимо от предпосевной обработки семян, концентрация железа, свинца, кадмия и кобальта уменьшалась. Содержание меди в надземной части растений в фазе 8 - 9 листьев в опыте было больше, чем в контроле в 1,5 раза, а в корнях – примерно во столько же меньше. Количество кобальта в опытных растениях до начала цветения было также выше в 2 раза, в период цветения в 1,2 раза. В течение развития растений отмечались разнонаправленные изменения концентраций поллютантов – кадмия и свинца. Содержание свинца к началу цветения в стеблях растений, семена которых подвергали предпосевной обработке, было выше, чем в контроле в 1,8 раз, а кадмия - в 4,3 раза меньше. В листьях контрольной группы свинца было меньше, чем в опытной в 1,5 раза, а кадмия – 1,2 раза больше. На этой фазе развития растений стебли растений опытной группы в 1,8 раза превосходили контроль по содержанию кобальта.

К завершению развития растений, по достижении кукурузой восковой спелости концентрация всех анализируемых элементов значительно уменьшилась. Наиболее интенсивно уменьшалось содержание химических элементов от вегетативных органов к семенам у растений, семена которых подвергали обработке. Содержание железа в семенах этих растений было

меньше, чем в контроле в 2,6 раза, марганца – в 2,3, меди – в 1,3, свинца – в 1,4, кадмия – в 1,6 раза и кобальта в 1,2 раза.

Было показано, что нанопорошки железа влияют на динамику аккумуляции поллютантов и эссенциальных элементов в процессе роста и развития растений. Направленность и диапазон этих изменений существенно варьирует в онтогенезе кукурузы. Но к завершению развития растений под влиянием нанометаллов происходит уменьшение кобальта, железа, меди, марганца, кадмия и свинца в зерне созревающей кукурузы (Еськов, Чурилов, 2011).

Обработка семян кукурузы (*Zea mays*) и вики (*Vicia sativa*) нанопорошками железа и меди перед посадкой не влияет на содержание данных элементов в почве. Анализ химического состава почвы на содержание железа, меди и кобальта после уборки урожая вики показал, что их уровень практически не изменялся, не зависимо от видов и доз нанометаллов и был на уровне контроля (Чурилов и др., 2010).

Подчеркивается, что исследования на различных сельскохозяйственных культурах проводятся совместно с производителями нанопорошков, так как свойства НЧ зависят от их размеров, способов получения и т. д. Для опытов, как правило, используются два типа нанопорошков: химико-металлургические порошки и плазмохимические. Созданы и используются составы для предпосевной обработки семян и вегетирующих растений, состоящие из гидрофобного полимера с эмульгированными в нем нанопорошками металлов. Для обработки различных сельскохозяйственных культур используются как металлы, так и их композиции – медь, цинк, железо, а так же оксиды меди и цинка, алюминия, молибдена (Чурилов и др., 2010).

В процессе исследований и производственных испытаний при обработке семян и вегетирующих растений нанопорошками, полученными различными способами, удалось установить особенности их влияния на прорастание семян, рост, развитие, урожайность растений и устойчивость к

заболеваниям, влияние концентраций, размеров НЧ и способов их нанесения. Существенное влияние на эффективность нанопорошков оказывает размер частиц нанопорошков и однородность их размеров (Schwab et al., 2015). Исследовали 8 образцов ультрадисперсного оксида меди, полученных физико-химическим способом и различающихся по площади поверхности. Концентрация каждого типа НЧ составляла 0,1 и 0,2 г/ на 1 кг семян. Было установлено, что более высокие концентрации всех препаратов снизили на 10% энергию прорастания семян, но не повлияли на их всхожесть. Первичный корешок и росток были лучше развиты в вариантах, где размеры частиц в препарате имели большую удельную поверхность. Исследованные препараты проявили положительные защитные свойства от почвенных патогенов. Было показано, что чем больше поверхность НЧ и меньше их размеры, тем эффективнее композиция, которую используют при работе (Чурилов, 2010).

Тем же автором проведено обоснование использования нанопорошков в определенных дозах путем анализа изображений интегральной оптической плотности поверхности зерна кукурузы. Была установлена зависимость оптической плотности поверхности зерна от концентрации металла и отмечена нелинейность этой зависимости. Так, при низких концентрациях металла (от 0,5-1,0 %) оптическая плотность увеличивается в 1,5 раза, а при дальнейшем увеличении концентрации оптическая плотность не изменяется. При низких концентрациях от 0,5-1,5 % покрытие зерна неравномерное, что подтверждают результаты исследований по устойчивости покрытий семян нанопорошками. Показано, что ультрадисперсные порошки металлов обладают пролонгированным действием: постепенно окисляясь в почве, они создают неблагоприятные условия для патогенных микроорганизмов и используются растениями в процессе роста и развития как микроэлементы. Были проведены исследования изменения содержания молибдена на разных стадиях развития ряда растений – капусты (*Brassica oleracea*), кукурузы (*Zea mays*), клевера (*Trifolium pratense*) и др., семена которых обрабатывали

различными концентрациями (0,5–10% по сухому веществу) ультрадисперсного порошка молибдена. Результаты опытов показали, что растения расходуют нанесенный на семена металл в течение всей вегетации и его количество пропорционально наносимой дозе. Содержание его в 3 раза выше в корнях растений, чем в надземной части. Для овощных культур оказалась эффективна обработка вегетирующих растений препаратами, содержащими нанопорошки металлов. Результативно было и совместное применение нанопорошков металлов с пестицидами. Проводились опыты по обработке растений льна в фазе ёлочки нопорошками с половинной дозой гербицида. Опытные растения развивались лучше контрольных, быстрее наступало созревание и плодоношение (Чурилов, 2007; Чурилов, 2009а; Чурилов, 2009б; Чурилов, 2010; Чурилов, Амплеева, 2007; Чурилов и др., 2008; Чурилов и др., 2009; Чурилов и др., 2010).

Таким образом, можно говорить о перспективности использования НМ в качестве стимуляторов роста и продуктивности сельскохозяйственных растений при условии предварительного исследования безопасности НЧ, что, безусловно, указывает на необходимость разработки специализированных методов экологической оценки.

Углеродные НЧ.

Наноструктурные материалы на основе углерода представляют особый интерес для исследователей. В частности, перспективы использования УНТ в биомедицине связывают с их способностью проходить через клеточную мембрану. На этой основе возможна разработка средств адресной доставки молекул в клетку (ПерсТ 16, вып. 4, 2009). При этом большая часть работ, встречающихся в доступной литературе, фокусируется на животных клетках. Разработка биосовместимых средств адресной доставки в растительные клетки тоже очень важна не только в теории, но и для разнообразных практических применений, например, для визуализации различных процессов в живых объектах – биоимэджинга (bioimaging). Препятствием для этого является наличие в растительных клетках клеточной стенки – плотной

дополнительной оболочки из целлюлозы и полисахаридов, в отличие от клеток животных, окруженных лишь мембраной. Функция клеточной стенки – механическая опора и защита клеток растительного организма, однако для преодоления такой преграды требуется использования достаточно сложных в методическом отношении подходов (<http://perst.issp.ras.ru/>).

В работе группы исследователей из Китая (Liu et al., 2009), установлено, что УНТ являются хорошими кандидатами на роль «векторов» для адресной доставки различных веществ в клетки растений. Исследовались суспензии оксидированных ОУНТ длиной до 500 нм с присоединенными нековалентной связью флуоресцентными метками. В качестве меток использовался fluorescein isothiocyanate (FITC). Как тест-объект использовалась клеточная культура растений табака (*Nicotiana tabacum* BY-2). Инкубация культуры клеток в присутствии ОУНТ/FITC осуществлялась в течение 2 ч при 26°C в стандартной культивационной среде. Методом конфокальной микроскопии был установлен факт проникновения УНМ в растительные клетки, поскольку внутри большинства из них наблюдали интенсивный флуоресцентный сигнал, испускаемый флуоресцентными метками FITC (Рис. 9).

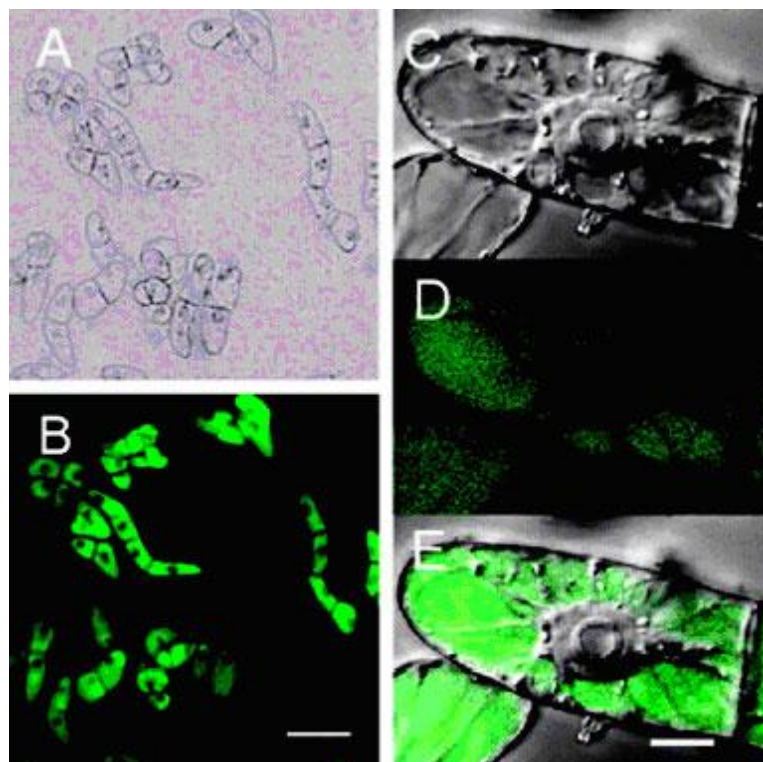


Рисунок 9 - Изображение клеток *Nicotiana tabacum* BY-2 после воздействия ОУНТ: А - светлое поле; В - флуоресценция; С - дифференционно-интерференционный контраст при большом увеличении; D - флуоресценция при большом увеличении; Е - наложение С и D. Масштаб 100 мкм для А и В и 10 мкм для С-Е (по Liu et al., 2009)

При этом уровень флуоресценции, отмеченный после инкубации клеток растений в культивационной среде, содержащей чистый FITC в том же количестве, в отсутствие ОУНТ оказался сопоставим с фоновым сигналом неэкспонированных клеток (Рис.10). Исходя из этого, авторы работы (Liu et al., 2009) пришли к выводу, что FITC проходит сквозь клеточные стенки лишь с помощью УНТ.

Уровень флуоресценции положительно коррелировал с ростом концентрации в среде ОУНТ/FITC. а так же с увеличением периода инкубации. Однако при снижении температуры флуоресценция снижалась независимо от времени воздействия и концентрации НЧ. Авторы исследования (Liu et al., 2009) связывают это с теорией, согласно которой

УНТ поступают в клетку посредством механизма эндоцитоза. Снижение температуры приводит к его ингибированию, что могло привести к наблюдаемым результатам. Химическое ингибирование эндоцитоза так же снизило уровень флуоресценции на 64%. Хотя механизмы эндоцитоза растительной клетки изучены менее детально по сравнению с животной клеткой, на основании полученных данных авторы предположили, что именно эндоцитоз ответственен за транспорт НЧ в клетку растений.

В результате было показано проникновение ОУНТ сквозь стенку растительной клетки. В данном случае FITC можно рассматривать не только как флуоресцентную метку для обнаружения УНТ, но и как модельную молекулу, которая, будучи прикреплена к УНТ, успешно была доставлена в растительную клетку, что указывает на перспективность данного способа адресной доставки.

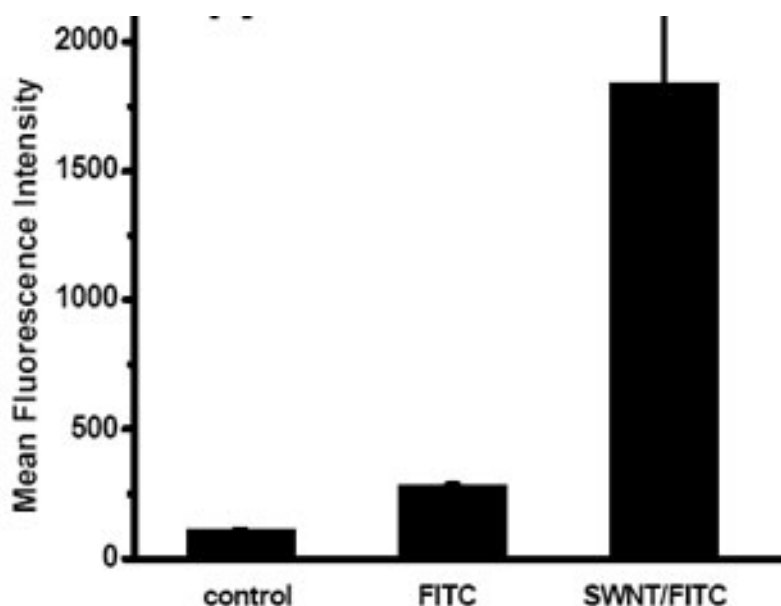


Рисунок 10 - Интенсивность флуоресценции клеток *Nicotiana tabacum* BY-2 из контрольной группы; клеток без ОУНТ, но с FITC; клеток с ОУНТ/FITC (по Liu et al., 2009)

Следующей задачей стало подтверждение возможности доставки макромолекул в клетку посредством УНТ. Для этого авторы исследования (Lin et al., 2009) маркировали с помощью флуоресцеина FITC одноцепочечные молекулы ДНК. Были приготовлены коллоиды из УНТ, обернутых ДНК, для подтверждения этого факта проводили исследование поверхности УНТ методом атомно-силовой микроскопии. Размерные характеристики комплексов ОУНТ/ДНК были схожи с таковыми у ОУНТ/FITC – не более 500 нм. Результаты исследования подтвердили ожидания – как видно из Рис. 11, взаимодействие конъюгатов ОУНТ/ДНК/FITC с клетками табака флуоресценция фиксировалась внутри более чем 80% клеток. Несмотря на отсутствие объяснений обнаруженной локализации ОУНТ/ДНК/FITC, авторы (Lin et al., 2009) предполагают, что результаты работы имеют хорошие перспективы в таких направлениях, как визуализация органелл и внутриклеточных процессов, генетические исследования и другие приложения клеточной биологии растений.

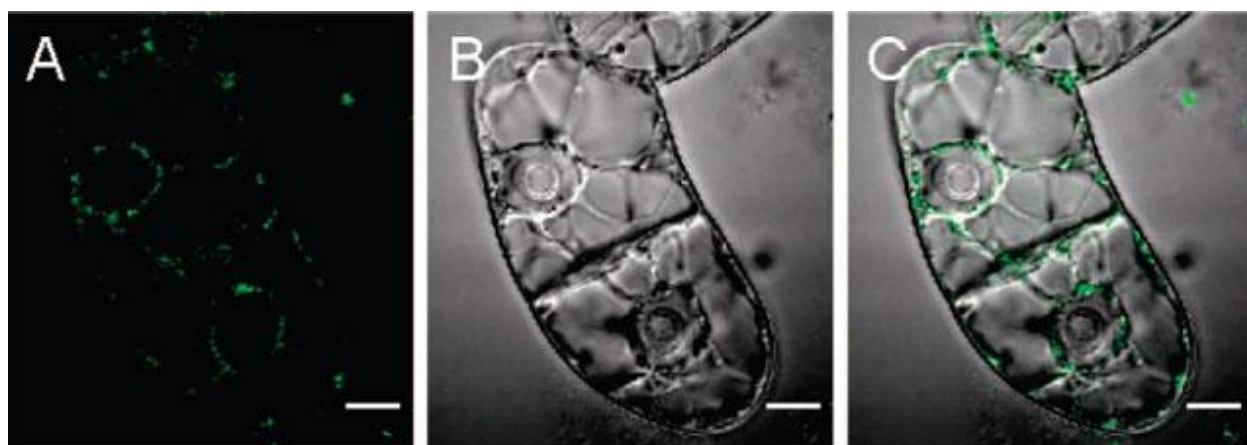


Рисунок 11 - Микрофотографии после инкубации с ОУНТ/ДНК(FITC): А - флуоресценция; В - светлое поле; С - комбинация А и В. Масштабная шкала 10 мкм (по Liu et al., 2009)

Была установлена возможность переноса в клетку с помощью ОУНТ как небольших молекул красителя, так и конъюгированных макромолекул одноцепочечной ДНК. Следующий вопрос заключался в наличии

цитотоксичности со стороны исследуемых УНТ. Для ответа на него было проведено два эксперимента. Во-первых, продолжительная инкубация в течение 24 часов клеток табака с конъюгатами ОУНТ/FITC и ОУНТ/ДНК(FITC) не стала причиной повреждения и гибели клеток – все они в конце эксперимента обладали нормальной морфологией и характеристиками цитоплазмы. Во-вторых, с помощью йодистого пропидия, который используется для окрашивания мертвых и поврежденных клеток, было проведено исследование препаратов ВУ-2 после воздействия ОУНТ/FITC и ОУНТ/ДНК(FITC). В результате флуоресценции, обычной для окрашивания данным препаратом ядер поврежденных клеток отмечено не было. Исходя из этого авторы (Lin et al., 2009) сделали вывод, что для клеток табака ОУНТ не токсичны.

Коллектив ученых из США опубликовал работу (DeRosa et al., 2010), в которой впервые было продемонстрировано свидетельство проникновения и накопление УНМ в рисе – одном из важнейших для мирового сельскохозяйственного производства растений, продукты на основе которого использует в пищу более 50% населения Земли.

Для этого использовались коллоидные растворы фуллерена C70 и МУНТ в NOM (natural organic matter). NOM – это естественный раствор органических веществ, который присутствует в окружающей среде и включает разнородную смесь подвергшихся биодеструкции органических остатков растений и животных. В предыдущих работах авторы установили способность NOM в водной среде служить детергентом, обеспечивающим высокую степень дисперсии УНМ, превосходя даже специализированные поверхностно-активные вещества (ПАВ). Используемая в работе взвесь МУНТ в воде с высокой концентрацией NOM (вода из поверхностного слоя реки Суванни) не теряла своих свойств более месяца. Концентрация взвешенных МУНТ в ней существенно превышала аналогичные показатели как в чистой воде, так и в воде с ПАВ, но NOM. Отмечается, что конкретные механизмы диспергирования пока не понятны и в значительной степени

связаны с особенностями NOM и УНТ. Но подобные результаты предполагают возможность переноса НЧ водой из естественных источников, что должно быть учтено в нанотоксикологических исследованиях (<http://perst.issp.ras.ru/>).

В соответствии с существующими природными аналогами, в которых концентрация NOM чаще всего не превышает 100 мг/л, были приготовлены экспериментальные растворы NOM 100 мг/л + фуллерен и NOM 100 мг/л + МУНТ (DeRosa et al., 2010). Семена риса нового урожая проращивались в модельных средах, содержащих взвеси C70-NOM и МУНТ-NOM разной концентрации. Эксперимент продолжался две недели. Также были заложены контрольные опыты, без использования NOM и НЧ. После этого проростки пересадили в большие контейнеры с почвой и доращивали в теплице до взрослого состояния. Таким образом, было получено первое поколение растений. Спустя полгода с растений группы «фуллерены» собрали семена и проращивали их на протяжении двух недель в отсутствие НЧ. При этом получили растения второго поколения.

Ткани всех растений на каждом из этапов исследовались с помощью световой и электронной микроскопии. В корнях и зернах растений первого поколения группы «фуллерены» авторы (DeRosa et al., 2010) обнаружили светонепрозрачные агрегаты, также черные гранулы накапливались в листьях и стеблях, концентрируясь в области сосудистой системы. Это позволило сделать вывод о перемещении НЧ с током воды и питательных веществ в растении. В меньшей степени агрегаты НЧ обнаруживались в тканях листьев растений второго поколения (Рис. 12).

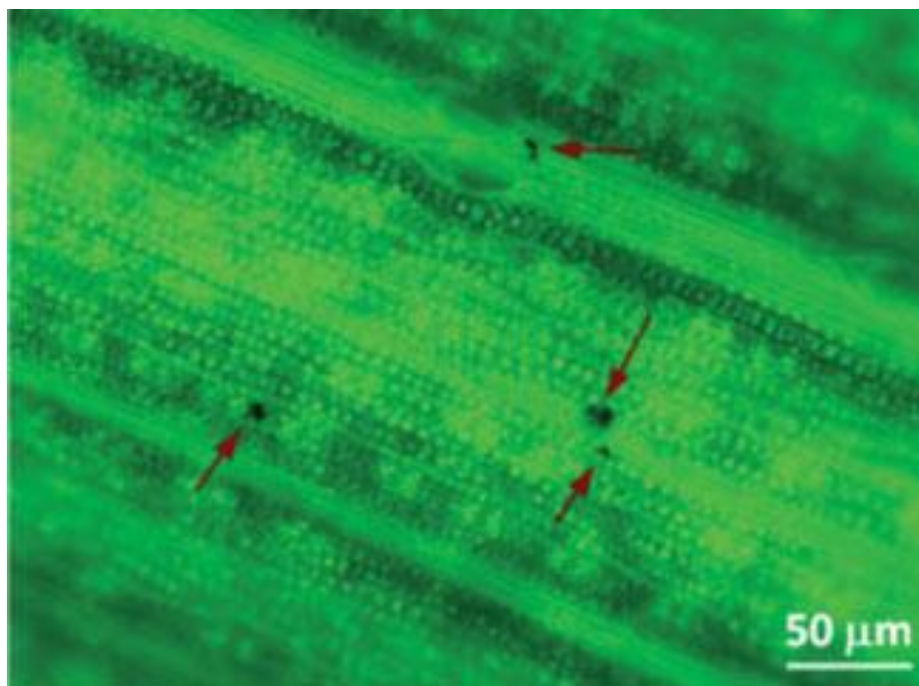


Рисунок 12 – Микрофотография ткани листа растения второго поколения. Стрелками обозначены скопления фуллеренов (по DeRosa et al., 2010)

Для выяснения природы обнаруженных скоплений авторы работы (DeRosa et al., 2010) использовали рамановскую и ИК-спектроскопию, которые позволили выявить преимущественное наличие в их составе фуллеренов. На основании результатов этих анализов, а также микроскопических исследований были установлены особенности локализации фуллеренов в зависимости от возраста растения. Так, если для двухнедельного возраста характерно накопление в корнях, листьях и стеблях, причем, без явной связи с концентрацией фуллеренов в исходном растворе (от 20 до 800 мг/л), то для полугодового возраста имеет место локализация в стебле в районе сосудистой системы. При этом в корневой системе фуллеренов не отмечалось. По мнению авторов, это доказывает наличие перехода НЧ из коревой системы в надземную часть растений.

Если использовать высокие концентрации фуллеренов, то их агрегаты способны закупорить сосуды растений или поступать в близлежащие клетки, создавая препятствия их питанию (Рис. 13). В таком случае возможны

негативные эффекты на рост и развитие растений. Так, в группе «фуллерены-NOM» наблюдалось месячное запаздывание в сроках цветения и образования семян по сравнению с контрольной группой, а также с теми растениями, которые выращивали с использованием NOM, но без НЧ.

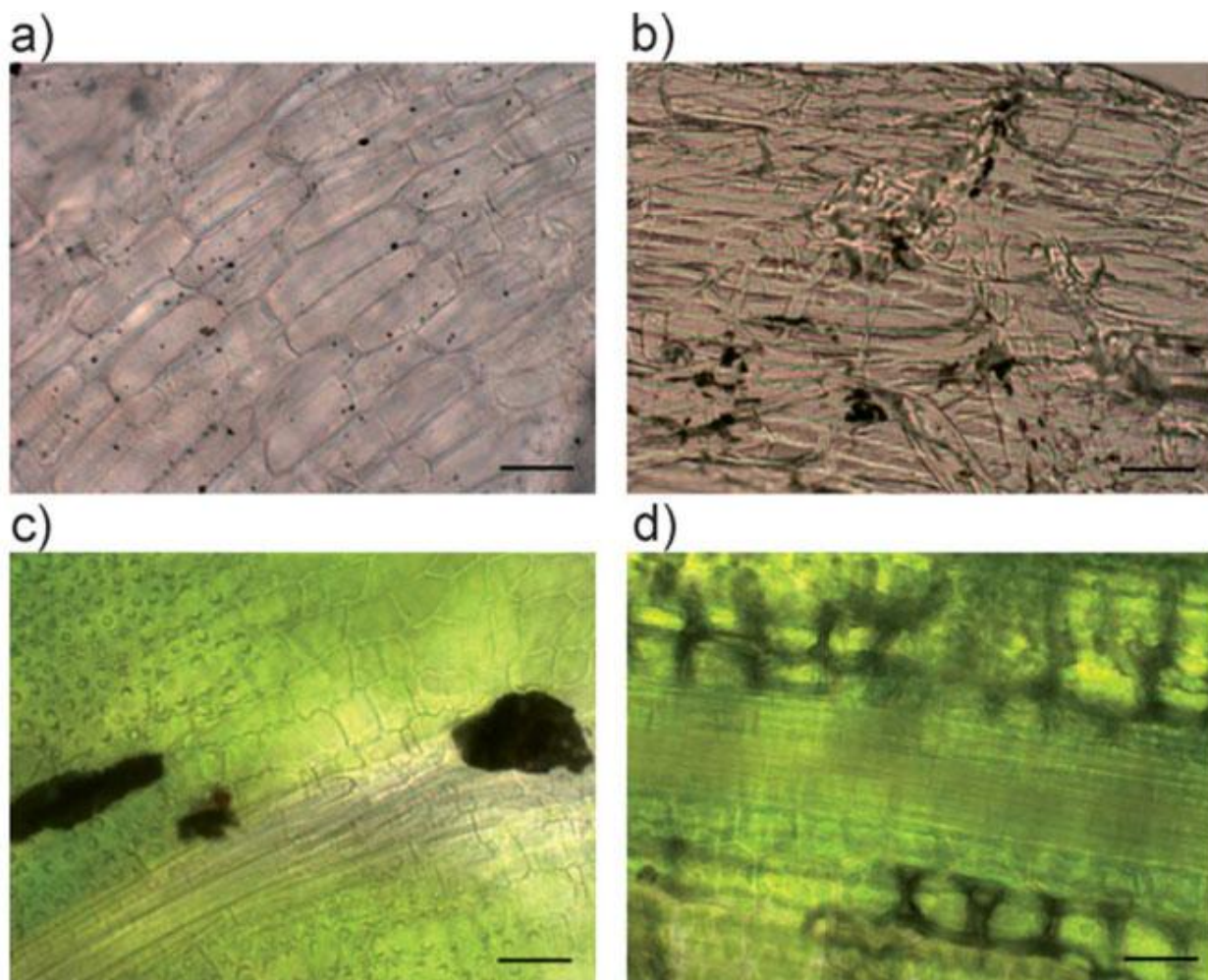


Рисунок 13 – а) Накопление фуллеренов в корнях риса; в) незначительное накопление МУНТ в корнях; с) образование гранул фуллеренов в сосудистой системе и близлежащем участке листа; d) поступление фуллеренов в ткани листа. Концентрация во всех случаях 400 мг/л, масштаб 25 мкм (по DeRosa et al., 2010)

Что касается МУНТ, то, в отличие от фуллеренов, их поступление в растения в использованных концентрациях (от 20 до 800 мг/л) было невысоким. Небольшое число светонепрозрачных агломератов наблюдали в

сосудистой системе, но в остальных тканях они практически не отмечались. Авторы исследования (DeRosa et al., 2010) предполагают, что это связано с формой нанотрубок, из-за которой их проникновение в корни затруднено (Рис. 14). Но в случае высокого содержания в исходной среде МУНТ также способны препятствовать нормальному питанию растений за счет накопления на поверхности корневых волосков.

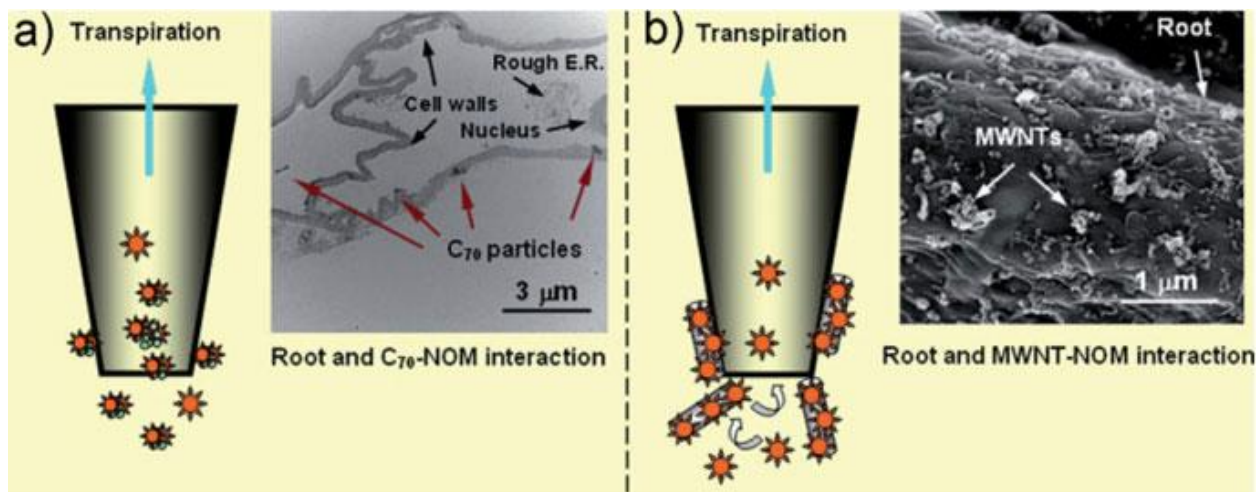


Рисунок 14 – Предполагаемые механизмы поступления молекул фуллеренов (а) и МУНТ (b) в корни растений. На врезках представлены: (а) ПЭМ изображение перехода фуллеренов в клетках корней и (b) СЭМ изображение адсорбированных на корнях МУНТ (по DeRosa et al., 2010)

В группе «МУНТ-NOM» растения риса отмечалось месячное запаздывание сроков формирования репродуктивных признаков аналогично группе «фуллерены-NOM». Такой важный показатель, как масса семян, снизился в случае фуллеренов на 8,6%, а в варианте МУНТ – на 11,2%.

Данная работа подтверждает эффективность междисциплинарных исследований, поскольку в числе ее авторов – материаловеды, биофизики, фитофизиологи. В результате были показаны не только особенности биоаккумуляции фуллеренов в растениях, но и переход НЧ в растения второго поколения через семена. Подвижность NOM является фактором, способствующим увеличению миграции НЧ. Авторы статьи (DeRosa et al.,

2010) видят перспективу дальнейших исследований в определении безопасности поступления данных типов НМ в продукты питания, а также оценки генетических изменений в ходе контакта НЧ с растениями.

Существуют исследования способности УНТ проникать внутрь семян растений. Зерна ряда растений могут аккумулировать свинец и другие тяжелые металлы. Исходя из этого строятся предположения о возможности НЧ преодолевать оболочку семян и непосредственно воздействовать на процессы их прорастания (<http://perst.issp.ras.ru/>).

Подобные свойства МУНТ исследовались в работе Ходаковской с соавторами (Khodakovskaya et al., 2009). В качестве тест-объекта были выбраны семена томата *Lycopersicon esculentum* (сорт Micro-Tom). Данный объект удобен для использования в условиях лаборатории в связи со своими миниатюрными размерами. Были приготовлены твердые культивационные среды, содержащие 10, 20, 40 мкг/мл МУНТ. На данных средах проращивали стерильные семена томатов. Условия выращивания семян контрольной группы были аналогичными, но без добавления МУНТ. Авторы отмечают, что уже на третий день в группах с МУНТ более трети семян дали всходы, тогда как аналогичные показатели в контроле были отмечены лишь к 12-му дню проращивания (Рис. 15).

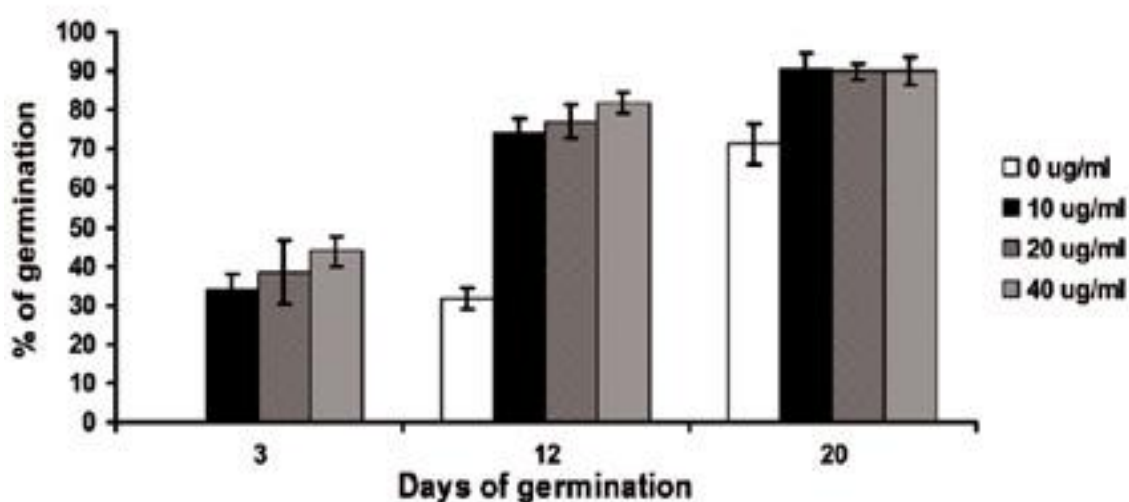


Рисунок 15 - Влияние МУНТ на прорастание семян (по Khodakovskaya et al., 2009)

Растения, культивируемые на МУНТ, характеризовались более интенсивными процессами накопления биомассы и нарастания побегов по сравнению с контрольной группой, при этом длина корней осталась неизменной (Рис. 16).

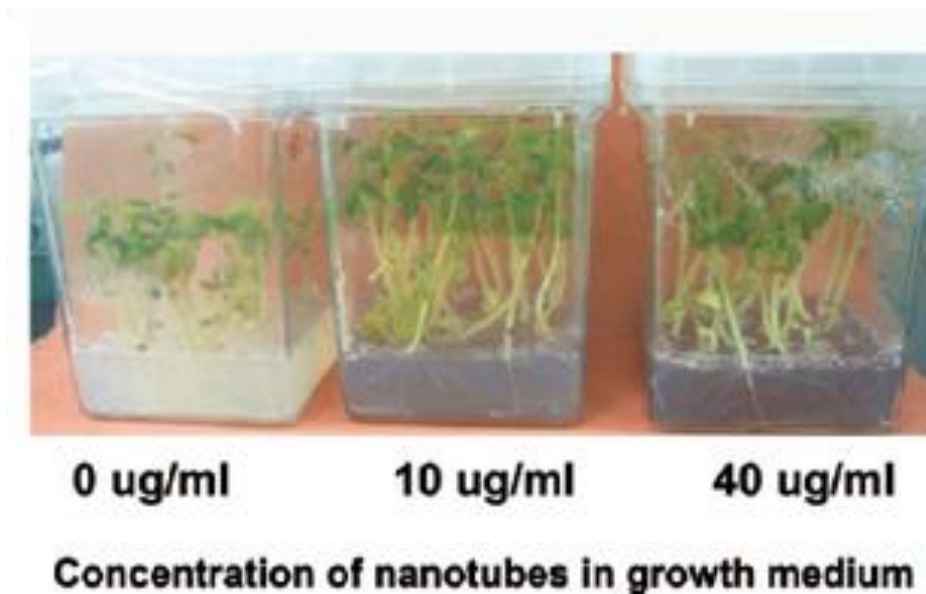


Рисунок 16 – Томаты после 27-дневного выращивания в контрольной среде (слева) и на средах, содержащих МУНТ: в середине – 10 мкг/мл и справа – 40 мкг/мл (по Khodakovskaya et al., 2009)

Проникновение МУНТ сквозь покровы семян было зафиксировано с использованием методов рамановской спектроскопии и ПЭМ (Рис. 17).

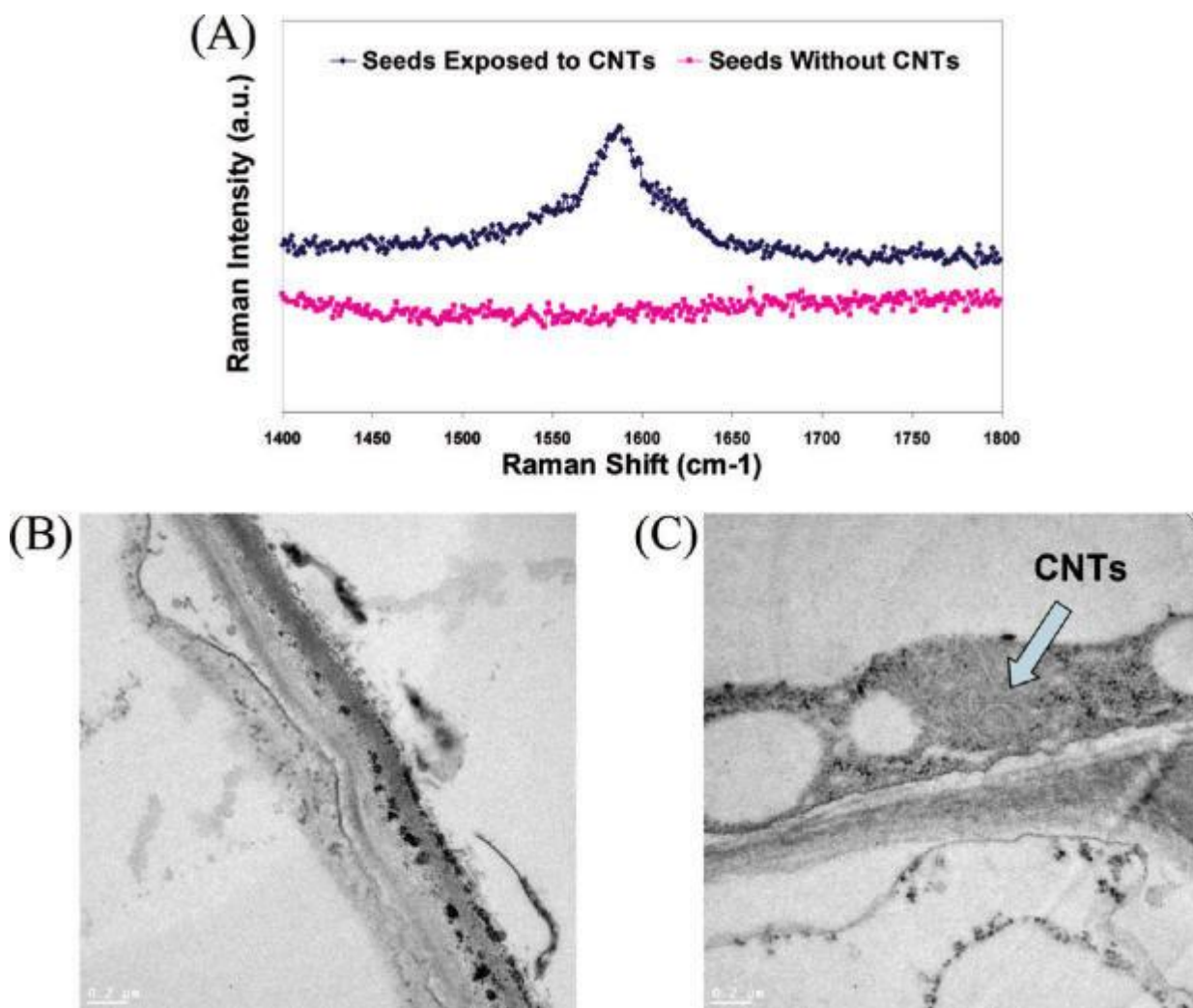


Рисунок 17 – Детекция МУНТ в семенах томатов (А) при помощи рамановской спектроскопии; (В) электронные микрофотографии тканей корней растений 25-дневного возраста из контрольной группы, (С) группы, выращенной на среде с МУНТ (Khodakovskaya et al., 2009)

Авторы работы (Khodakovskaya et al., 2009) предположили, что механизмом, способствующим процессам прорастания, является увеличение поступления воды в семя благодаря МУНТ. При этом дискуссионным остался вопрос, каким образом МУНТ способствуют проникновению воды в растения. Как было отмечено ранее, согласно другим авторам (DeRosa et al., 2010), МУНТ, адсорбируясь на поверхности корней, затрудняют водное питание. В статье (Khodakovskaya et al., 2009) было предложено следующее объяснение: вероятно, УНТ, «пронзая» оболочку семян, создают дополнительные каналы для поступления воды к зародышу. Для проверки

данной гипотезы был проведен следующий эксперимент. Семена томатов в течении 2-х часов высушивали при температуре 250°C, после чего оценивали изменение массы. Выяснилось, что исходные (сухие) семена, которые не высевали на питательную среду, содержали 18,4% влаги. При этом семена после двухдневного культивирования на стандартной среде содержали 38,9% воды, а семена из группы, выращиваемой на среде с МУНТ было уже 57,6%. Это позволило авторам (Khodakovskaya et al., 2009) сделать вывод о росте водообеспечения под действием нанотрубок и, соответственно, стимуляции ими процессов прорастания семян.

Хотя авторы работы (Khodakovskaya et al., 2009) выдвинули ряд предположений о механизмах наблюдаемых явлений, как, например, образование новых пор в оболочке семян или воздействие МУНТ на уже имеющиеся водные поры – аквапорины, данные версии до сих пор не получили подтверждения. Однако стоит отметить, что результаты исследования могут найти практическое применение в таких сферах, как агротехнологии, садоводство и биоэнергетика. Можно предположить, что на базе МУНТ, проникающих через плотные клеточные стенки и оболочки семян растений, будут разработаны системы доставки биологически активных компонентов в растения, то есть будут созданы наноудобрения. В данной сфере реализация достижений нанотехнологий в настоящее время идет гораздо слабее, чем в таких отраслях, как фармацевтика. Азот – важнейший питательный элемент растений – по мнению авторов статьи (Khodakovskaya et al., 2009) один из кандидатов на роль транспортируемого с помощью наносистем компонента. Эффективность усвоения азота растениями из почвы невелика – не более 50% вследствие выноса растворимых нитратов и аммонийных солей, а также перехода в газообразное состояние. «Контейнеры» на основе УНТ смогут предохранить доступный для растений азот от воздействия воды и почвенной микробиоты, позволяя транспортировать его в растение. В перспективе подобные технологии помогут контролировать длокализацию выделения азота внутри растения и

его интенсивность, что будет являться шагом в направлении создания «умных» удобрений. При этом, безусловно, очень важными остаются вопросы потенциальной опасности воздействия НМ на окружающую среду и организм человека, поэтому результаты исследования (Khodakovskaya et al., 2009) могут быть полезны при проведении экотоксикологической оценки УНТ.

В работе Смирновой с соавторами (Смирнова и др., 2011) методом просвечивающей электронной микроскопии на растении эспарцет (*Onobrychis arenaria*) показано, что МУНТ, подобно фуллеренам, проникают не только в корни, но и достигают листьев растений, поднимаясь по проводящей системе. При концентрации НМ от 100 до 1000 мг/л наблюдалась стимуляция вегетации проростков и усиление пероксидазной активности.

Исследователи из Индийского Технологического Института в Канпуре утверждают, что УНТ, будучи безвредными для растений, способствуют их росту и развитию растений. В работе (Tripathi et al., 2011) ученые использовали для полива турецкого гороха (*Cicer arietinum*) растворы, включающие растворимые фракции УНТ, концентрация которых составляла до 6 мкг/л. Отмечается, что исходным сырьем для получения нанотрубок служили карбонированные нити на основе волокон бамбука или шерсти. Растворимости УНТ в воде достигали путем функционализации их поверхности карбоксильными группами.

Было обнаружено, что исследуемые НЧ ускоряют рост всех органов растений – корней, побегов и стеблей. Как и авторы работы (Khodakovskaya et al., 2009), коллектив авторов (Tripathi et al., 2011) придерживается мнения, что УНТ способствуют образованию в растениях дополнительных «каналов», по которым вода и растворенные в ней питательные вещества эффективно перемещаются внутрь растения. Исходя из этой теории, капиллярная система растения дополняется и частично замещается нанотрубками. С этим явлением исследователи связывают интенсификацию биосинтеза в растительных клетках под действием УНТ.

Авторы (Tripathi et al., 2011) считают, что УНТ перспективны в таких направлениях, как исследование фитопатологий и физиологии роста и развития растений, связывая это с возможностью предварительного прикрепления к НЧ флуоресцентных меток, как это было продемонстрировано в работе (Lin et al., 2009). Ученые предполагают, что с использованием нанотрубок появится возможность оценки оптимального для нормального роста и развития растения количества воды.

Отмечается, что существенная проблема, которую необходимо учитывать при изучении УНТ – их возможная токсичность. Однако исследователи (Tripathi et al., 2011) предполагают, что мнение о высокой степени опасности УНТ базируется на случаях повреждения клеток «идеальными» нанотрубками, с лишенной дефектов поверхностью. Такие НЧ, по мнению авторов обсуждаемой статьи, на самом деле способны нарушать целостность клеточных мембран и вызывать связанные с этим негативные эффекты. Возможно, гидрофильные УНТ будут проявлять минимальную цитотоксичность. Авторы работы (Tripathi et al., 2011) прогнозируют перспективность применения нанотрубок в борьбе с заболеваниями растений, при создании сред для гидропоники, в области фиторемедиации (раздел биотехнологии, специализирующийся на удалении загрязнений воды и почвы при помощи растений).

Анализ результатов последней работы дает возможность предполагать, что в некоторых случаях УНТ способны позитивно влиять на растительные организмы. Но это предположение нет оснований рассматривать в качестве обобщения по отношению ко всем УНМ. Существенную роль играют свойства конкретного НМ, видовые особенности растения, специфика условий выращивания. Можно заключить, что только значительное число дополнительных исследований позволит дать окончательный ответ на вопрос о том, вредны или полезны УНТ для растений (<http://perst.issp.ras.ru/>).

1.2.4 Воздействие наноматериалов на млекопитающих

Вопросы воздействия УНМ на млекопитающих в настоящее время наиболее разработаны в связи с угрозой экспозиции персонала при производстве НМ. Работы, появившиеся в последнее время, подтверждают наличие вреда для здоровья сотрудников предприятий nanoиндустрии (Фатхутдинова и др., 2013).

Взаимодействие между УНТ и клетками описывалось многими исследовательскими группами и все они пришли к заключению, что токсичность УНТ *in vivo* зависит от типа УНТ, включая метод производства, вид загрязнений и метод очистки (который может повлиять на состояние стенок), длину, степень агрегации, поверхностное покрытие и химические модификации. Более того, особое внимание требуется при подборе реагентов для оценки жизнеспособности клеток (Kroll et al., 2009), т.к. данные НЧ могут взаимодействовать со взятыми пробами и даже с диспергирующим веществом, вызывая проявления, скорее, вторичной, а не первичной токсичности (Casey et al., 2007).

Эти физические и химические характеристики действительно важны в исследованиях *in vivo*. Тем не менее, необходимо принимать во внимание и другие явления, которые могут иметь место в сложных живых системах, например, взаимодействие УНТ с несколькими различными клетками одновременно, биотрансформацию, естественную реакцию на инородное тело и т.д.

Взаимоотношения «организм – УНТ» были изначально описаны в исследованиях токсичности *in vivo*, проводившихся для оценки рисков экспозиции на рабочем месте. Предполагалось, что взвешенные в воздухе УНТ могут потенциально представлять опасность для людей, ежедневно обращающихся с данным материалом, проникая в организм преимущественно респираторным путем. Тем не менее, в последние годы расширение сфер возможного применения УНТ в биомедицине привело к росту числа работ, посвященных измерению их потенциальной токсичности при черезкожном типе введения.

В 2001 потенциал УНТ вызывать раздражения кожи был оценен в процессе проведения двух стандартных дерматологических тестов (Nuczko, Lange, 2001). Во-первых, у 40 волонтеров со склонностью к аллергии в течение 96 часов проводилась кожная проба, состоящая в наложении фильтровальной бумаги, пропитанной водной суспензией неочищенных УНТ, синтезированных методом дугового разряда. Во-вторых, на 2 кроликах-альбиносах был проведен модифицированный глазной тест Дрейза с использованием водной суспензией неочищенных УНТ, животные наблюдались в течение 72 ч. после введения агента. Оба теста показали отсутствие раздражения по сравнению с контролем – не содержащей УНТ сажей, и был сделан вывод, что «в обращении с данными наноструктурами никаких особых мер безопасности не требуется» (Nuczko, Lange, 2001).

Во второй работе, состоящей из двух частей, были проведены другие исследования по обнаружению форм экспозиции и токсичности ОУНТ (Maunard et al., 2004). Задачей ученых стала оценка физической природы аэрозоля, формирующегося из ОУНТ при их механическом перемешивании. Исследование дополнялось полевыми экспериментами, в которых оценивалась степень экспозиции нанотрубок при их попадании на кожу или во взвешенном в воздухе состоянии при обращении с неочищенным материалом. Хотя лабораторные опыты указывали на то, что неочищенный материал, состоящий из ОУНТ, может в процессе интенсивного перемешивания стать источником взвешенных в воздухе мелких частиц, полевые эксперименты показали, что их концентрация в процессе обращения с материалом весьма невысока. Оценки содержания в воздухе рабочей зоны материалов, содержащих нанотрубки, указывают на то, что их концентрация ниже 53 мкг/м^3 на всех этапах работы. А количество ОУНТ на перчатках, накапливающаяся в процессе обращения с НМ, оценивалась в пределах 0,2 - 6 мг на одну руку (Maunard et al., 2004).

Поскольку УНТ имеют очень незначительный вес, они могут подниматься в воздух и, потенциально, проникать в легкие; поэтому самые первые исследования *in vivo* оценивали их пульмонарную токсичность (Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004).

С этой целью изучались три типа ОУНТ – нативные, очищенные и функционализированные УНТ CarboLex. В первом материале много примесей железа, а второй содержит примеси никеля и иттрия. Частицы перемешивались 2 мин. в стеклянной пробирке с последующей гомогенизацией ультразвуком (0,5 мин) в термоинактивированной сыворотке крови мыши. Полученный материал вводился мышам интратрахеально, в дозировке 0, 0,1 или 0,5 мг УНТ, технического углерода или частиц кварца, использовавшихся в качестве позитивного и негативного контроля, соответственно. Через 7 и 90 дней после однократного введения животные усыплялись и проводилось гистопатологическое исследование легких. Все случаи введения УНТ вызвали развитие дозозависимой эпителиоидной грануломы и, в некоторых случаях, интерстициального воспаления у всех животных, усыпленных через 7 дней. Подобные повреждения были постоянными и проявлялись еще более ярко в группах, усыпленных через 90 дней. Легкие некоторых животных демонстрировали признаки перибронхиального воспаления и некроза, распространявшегося на альвеолярные перегородки. Легкие мышей, получавших технический углерод, остались нормальными, а у получавших высокие дозы кварца – с воспалениями от небольших до умеренных. Эти результаты показывают, что в подобных условиях, если УНТ достигают легких, они демонстрируют значительно более высокую токсичность, чем сажа и могут быть более токсичны, чем кварц, который в профессиональной гигиене считается веществом с высокой степенью опасности при хроническом вдыхании (Lam et al., 2004).

Подобным образом проводилось другое исследование воздействия на легкие нативных ОУНТ (Warheit et al., 2004). Цель работы состояла в оценке острой легочной токсичности интратрахеально введенных нанотрубок у крыс. Использованные УНТ были синтезированы методом лазерной абляции с массовой долей аморфного углерода 30-40% и по 5% никеля и кобальта. В легкие крыс вводились дозы 1 и 5 мг/кг следующих изучаемых или контрольных материалов: ОУНТ, частицы кварца (положительный контроль), частицы карбонильного железа (отрицательный контроль), а также чистая дисперсионная среда – фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) и 1%

Tween 80 (Warheit et al., 2004). После экспозиции легкие крыс исследовались через 24 ч., 1 неделю, 1 месяц и 3 месяца после введения с применением методов биомаркеров бронхоальвеолярной жидкости и клеточной пролиферации. Кроме этого проводилось гистопатологическое исследование легочной ткани. Высокие дозы ОУНТ (5 мг/кг) приводили к смерти примерно 15% крыс через 24 ч. после введения. Причиной гибели была механическая блокировка нанотрубками верхних дыхательных путей. У выживших животных ОУНТ производили временные эффекты воспаления и клеточного поражения. Результаты гистопатологического обследования легких показали, что у крыс легочная экспозиция ОУНТ вызывает дозозависимые серии мультифокальной гранулемы, являющиеся свидетельством реакции тканей на введение инородных тел. Тем не менее, их распределение было неравномерным и спустя месяц после введения не отмечалось появления новых очагов. Образование ОУНТ-индуцированных мультифокальных гранулом не соответствовало другим результатам исследования, таким как отсутствие легочной токсичности, определяемой по параметрам лаважа; отсутствие легочной токсичности, определяемой по измерению параметров клеточной пролиферации; отсутствие дозозависимости; неравномерное распределение повреждений; наличие неспецифических эффектов легочной токсичности, связанных с воздействием пыли и снижение проявления биоповреждений с течением времени. Наличие гранулом при условии отсутствия других проявлений поражения легочной ткани, определяющихся по пульмонарным критическим точкам, не соответствовало обычным схемам возникновения и течения процессов воспаления/фиброза, индуцируемым фиброгенными пылевыми субстанциями, такими как кварц, асбест и волокна карбида кремния (Warheit et al., 2004).

Таким образом, в то время как первая группа авторов (Lam et al., 2004) заключила, что ОУНТ более токсичны, чем НЧ кварца и кристаллические частицы кремнезема, вторая группа (Warheit et al., 2004) наблюдала лишь временные легочные воспаления и формирование гранулом после экспозиции ОУНТ, в противовес длительному воспалению легочной ткани, цитотоксичности, усиленной пролиферации клеток легкого, аккумуляции пенистых макрофагов и фиброзу в результате экспозиции частицами кварца.

Различие в результатах может, с одной стороны, объясняться видовыми различиями лабораторных животных (мыши и крысы), но, скорее всего, разница состоит в дизайне экспериментов (Warheit, 2006).

Помимо этого, респираторная токсичность УНТ оценивалась по результатам интратрахеального введения нативных и размолотых МУНТ, диспергированных ультразвуком в стерильном 0,9 % растворе Tween 80 в дозах 0,5; 2,0 и 5,0 мг, что примерно соответствует 2,2; 8,9 и 22,2 мг/кг массы тела крыс линии Sprague-Dawley (Muller et al., 2005). Введенные УНТ обнаруживались в легких через 60 дней (80% и 40% от самой низкой дозы). Оба типа УНТ вызывали воспалительные и фиброзные реакции (Muller et al., 2005). Через 2 месяца изменения в легких, вызванные введением МУНТ, характеризовались формированием богатых коллагеном гранулом, выступающих в бронхиальный просвет, совместно с альвеолитом, наблюдаемым в окружающих тканях. Эти повреждения были результатом аккумуляции крупных агломератов МУНТ в дыхательных путях. Размолотые МУНТ равномернее распределялись в легочной паренхиме и также вызывали воспалительные и фиброзные реакции. И целые, и измельченные МУНТ стимулировали продукцию фактора некроза опухолей TNF- α в легких животных (Muller et al., 2005).

Валидность метода интратрахеального введения с точки зрения физиологии довольно спорна, так как в реальных условиях вдыхаемые частицы, скорее всего, встретят несколько барьеров в верхних дыхательных путях, прежде чем попадут в трахею и легкие. Тем не менее, очищенные ОУНТ вызывали воспаление, фиброз и формирование грануломы у мышей линии C57BL/6 даже при введении методом фарингальной аспирации, как было продемонстрировано в работе Шведовой с соавторами (Shvedova et al., 2005). Использованные в этом исследовании нанотрубки были произведены методом NiPco и очищены с помощью кислоты. УНТ составляли более 99% углерода в образцах. Животные подвергались воздействию ОУНТ в дозировках 0, 10, 20, 40 мкг/мышь. Контролем служили ультрадисперсные технический углерод и SiO₂ в дозировке 40 мкг/мышь. Животные усыплялись через 1, 3, 7, 28 и 60 дней после воздействия. Быстрое развитие фиброза у мышей наблюдалось в двух четко различающихся морфологических формах:

1) вызванная ОУНТ гранулома, в основном ассоциированная с гипертрофированными эпителиальными клетками, окружающими плотные агрегаты ОУНТ микрометрового размера и 2) диффузный интерстициальный фиброз, скорее всего, ассоциированный с дисперсными ОУНТ, и утолщение альвеолярных стенок. Эти различия в морфологии фиброза были отнесены исследователями к особенностям структурной морфологии компактных агрегатов и отдельных ОУНТ. Важно отметить, что скопления коллагена и эластина наблюдались как в грануломатозных областях, так и в зонах, удаленных от грануломы. В ответ на введение ОУНТ также наблюдалось увеличение альвеолярных клеток II типа (АТ-II) – клеток-предшественников, которые реплицируются после гибели альвеолярных клеток I типа (АТ-I). Более того, у мышей под воздействием ОУНТ зарегистрированы случаи функциональной респираторной недостаточности и сниженная способность к самоочищению от бактерий *Listeria monocytogenes* (Shvedova et al., 2005).

В работе Мюллера с соавторами (Muller et al., 2008), ориентированной на изучение механизмов биоповреждений, исследовались физико-химические детерминанты токсического действия МУНТ. В этом эксперименте токсичность МУНТ оценивалась после того как трубки нагревались до 600°C (что приводило к потере оксигенированных функциональных групп углерода и к редукции оксидированных металлов); до 2400°C (что устраняло структурные дефекты и металлы) или после того, как МУНТ, нагретые до 2400°C, размалывались (введение структурных дефектов в избавленные от металлов нанотрубки). Готовилась суспензия МУНТ в 1% Tween 80 и физрастворе, после чего суспензия вводилась крысам интратрахеально (2 мг на крысу). Результаты показывают, что легочная токсичность (и генотоксичность, определенная *in vitro*) снижались при нагревании, но восстанавливались после измельчения, что указывает на то, что токсические свойства, в основном, зависят от наличия дефектов в углеродной решетке (Muller et al., 2008).

Наконец, для проверки гипотезы о связи между токсическим воздействием на легкие агрегатами УНТ, авторы работы (Mutlu et al., 2010) интратрахеально вводили мышам неочищенные агрегаты и сильно диспергированные ОУНТ. НМ вводились в нативном виде, либо тщательно

диспергировались в PBS или в плюрониловом растворе в дозе 40 мкг/мышь. Доза подбиралась так, чтобы соответствовать или превосходить те, которые по предыдущим исследованиям вызывали легочный фиброз у мышей (Mutlu et al., 2010; Shvedova et al., 2005). Авторы отмечают, что воспаление легочной ткани, вызванное ОУНТ, было минимальным по сравнению с вызываемым городской пылью или волокнами асбеста (использовавшимися в качестве положительного контроля). Агрегаты ОУНТ в PBS вызывали появление областей хронического воспаления, в то время как сильно диспергированные ОУНТ не вызывали ни воспаления, ни фиброза. Более того, разрозненные на наноразмерном уровне ОУНТ захватывались альвеолярными макрофагами и через некоторое время удалялись из легких. Помимо этого, вводя неочищенные УНТ, авторы исследования (Mutlu et al., 2010) избегали эффекта, который мог быть вызван поверхностными дефектами стенок трубок (Ziegler et al., 2005), что могло усилить производство коллагена (Mercer et al., 2010).

В исследовании Кобаяши с соавторами (Kobayashi et al., 2010), в котором крысам вводилось 0,04; 0,2 или 1 мг/кг диспергированных МУНТ было отмечено, что воспалительные реакции наблюдаются только в легких животных, получавших самую высокую дозу материала. Более того, авторы статьи (Kobayashi et al., 2010) не обнаружили никаких признаков хронического воспаления, таких как ангиогенез или фиброз, вызванных введением МУНТ. Микроскопическое исследование показало, что осаждающиеся в легких агрегаты МУНТ фагоцитировались альвеолярными макрофагами и аккумулировались в легких, находясь в них на протяжении 6 месяцев после экспозиции. Эти агрегаты локализовались в альвеолярных или интерстициальных макрофагах, в то время как отдельные МУНТ в клетках интерстициальной ткани обнаружены не были. Тем не менее, на представленных авторами (Kobayashi et al., 2010) микрофотографиях (Рис. 18) заметно, что МУНТ выступают за пределы макрофагов в разных направлениях, это называется неполным или незавершённым фагоцитозом, что, как известно, является предвоспалительным состоянием (Balkwill, Mantovani, 2001).

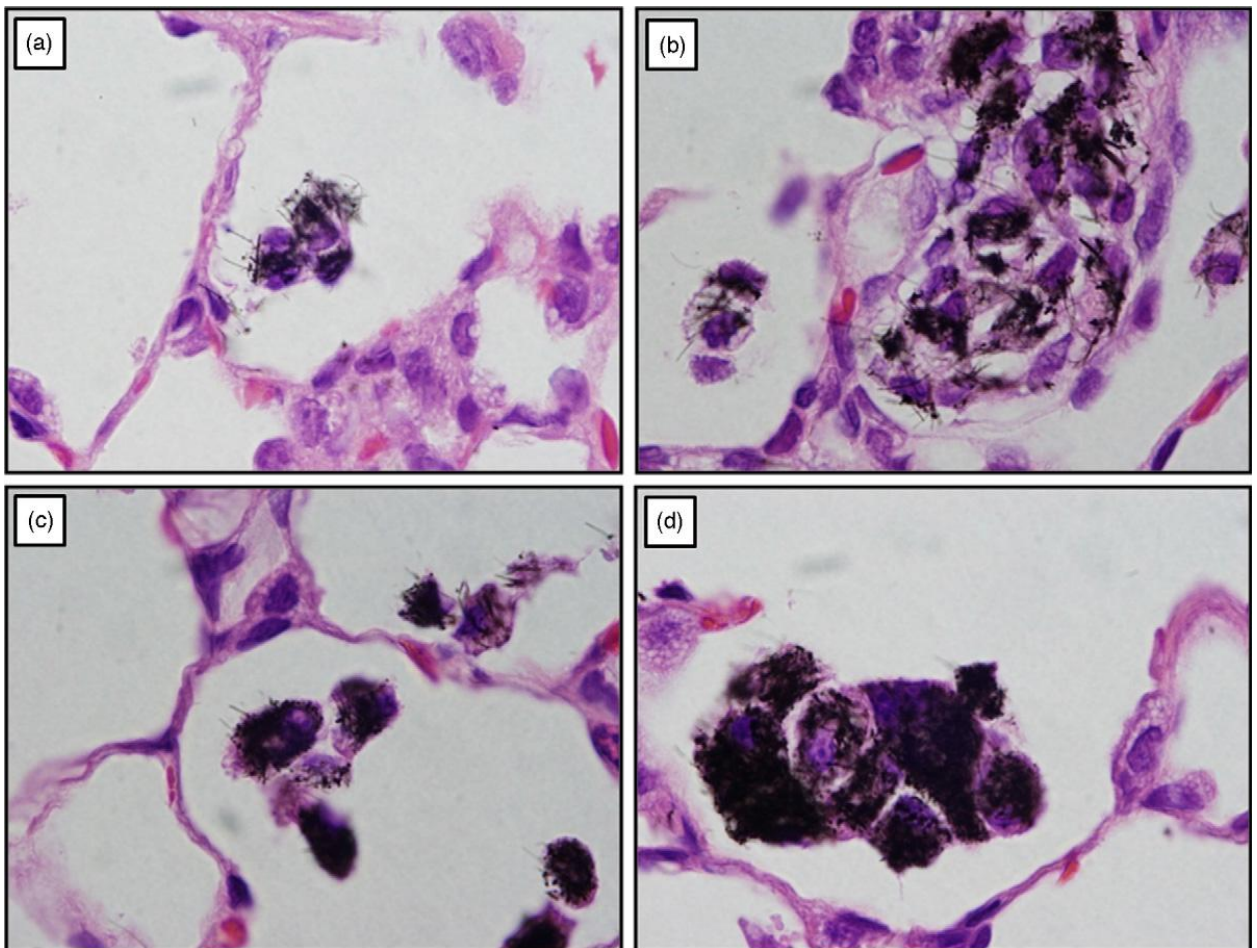


Рисунок 18 - Микрофотографии МУНТ в легких крыс, экспонированных 1 мг/кг МУНТ: 3 дня (a), 1 неделю (b), 1 месяц (c), и 6 месяцев (d). Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение: x200 (по Kobayashi et al., 2010)

По данным авторов (Kobayashi et al., 2010), длина использованных МУНТ была менее 20 мкм, но после измерения трубок внутри альвеолярных макрофагов они заключили, что средняя длина составляла около 1,5 мкм, хотя наблюдались отдельные трубки длиной до 6 мкм.

В противоположность данному исследованию, в работе Моримото с соавторами (Morimoto et al., 2011) было показано, что сильно диспергированные МУНТ могут, в зависимости от пути введения (т.е. ингаляционного или интратрахеального) и от дозы, индуцировать легочные повреждения. Используемые в этом исследовании нанотрубки размалывали во фруктозе, позже фруктозу смывали водой и перекисью водорода. Авторы (Morimoto et al., 2011) отмечают, что данный процесс приводил к легкому

окислению трубок, которые впоследствии диспергировались в 0,05% растворе Triton X-100. Triton X-100 часто используется в клеточной биологии для разрушения клеточной мембраны и цитоплазмы, чтобы получить доступ к клеточному ядру. В эксперименте с интратрахеальным введением две единичные дозы (0,2 мг или 1 мг/животное, средняя длина частиц - 1,1 мкм) вводились крысам, исследование продолжалось в течение 6 месяцев. В то время как у тест-объектов, получавших 0,2 мг материала отмечались лишь временные признаки инфильтрации воспалительных клеток, высокая доза вызывала небольшие грануломатозные повреждения и временные отложения коллагена. Параллельно авторы (Morimoto et al., 2011) проводили ингаляционные исследования диспергированных МУНТ в средней концентрации $0,37 \pm 0,18$ мг/м³. Крысы подвергались воздействию аэрозольных частиц по 6 часов в день, 5 дней в неделю на протяжении 4 недель. В конце эксперимента диспергированные частицы со средней длиной 1,1 мкм вызвали только минимальное временное воспаление, не приводящее к инфильтрации нейтрофилов в альвеолярное пространство. Более того, не наблюдались ни грануломатозные изменения, ни отложения коллагена (Morimoto et al., 2011).

Существующие исследования показывают, что благодаря взаимодействию Ван-дер-Ваальса отдельные ОУНТ стремятся к формированию крупных агрегатов, как в воздухе, так и в водных растворах, получившиеся агрегаты достигают до 100 мкм в диаметре. Воздействие промышленных НЧ на рабочем месте представляет собой наиболее вероятный риск и может иметь серьезные последствия для здоровья. В связи с этим представляют практический интерес исследования, показавшие, что по отношению к мышевидным грызунам токсичность не регистрировалась в случае интратрахеального введения ОУНТ диспергированных до состояния отдельных частиц в дозировке 1,6 мг/кг (Mutlu et al., 2010), а также аналогично диспергированных МУНТ в дозировке 0,66 мг/кг (Morimoto et al., 2011). Нужно отметить, что для человека среднего веса эти дозировки соответствуют однократно принятой дозе в 112 г и 46 г, соответственно.

Аналогия между УНТ и волокнами асбеста была отмечена в конце 90-х (Service, 1998). Термин «асбест» относится к целому ряду волокнистых

силикатов, которые в прошлом широко применялись в промышленности из-за своих физических свойств, таких как поглощение звука, умеренная прочность на разрыв и стойкость к пламени, нагреванию, электрическим и химическим повреждениям. Волокна асбеста имеют высокое аспектное соотношение и характеризуются значительной химической стабильностью в физиологических средах (Kane, Hurt, 2008). Связанные с воздействием асбеста патологии, особенно фиброз легких (асбестоз) и рак легких (мезотелиома), чаще всего начинающиеся в плевре, внешней оболочке легких, в свое время послужили причиной международного запрета асбеста с позиций гигиены труда (Donaldson et al., 2010) и вызвали обоснованные опасения по поводу содержания в воздухе этих волокон.

Каждое легкое окутано плеврой, мембраной, имеющей форму двойного замкнутого мешка. Сторона мембраны, обращенная к легкому и снабженная висцеральным мезотелиальным слоем называется висцеральным листком плевры, а мембрана, прикрепленная к грудной клетке и выстланная париетальным мезотелиальным клеточным слоем, называется париетальным листком плевры. Мезотелий плевры является первичной мишенью для вдыхаемых волокон (Donaldson et al., 2010). Промежуток между висцеральной и париетальной плеврами содержит плевральную жидкость и популяцию плевральных макрофагов. Плевральная жидкость продуцируется преимущественно капиллярами межрёберных артерий и эвакуируется лимфатической системой (Lai-Fook, 2004). Эта циркуляция очень важна для очищения от частиц и волокон, проникших в плевральную полость (Donaldson et al., 2010). В то время как точный механизм накопления волокон в плевральном мезотелии остается невыясненным, исследования указывают на то, что присутствие неразрушающихся волокон в париетальной плевре инициирует мезотелиальные повреждения и воспаления, которые со временем приводят к мезотелиоме. Когда диаметр волокон мал, волокна располагаются в направлении тока жидкости и проникают глубоко в легкие. Волокна, в зависимости от их длины, в той или иной степени поглощаются макрофагами. Если длина волокна слишком велика, фагоцитоз не может произойти в полной мере. Это явление – «незавершенный» фагоцитоз – приводит к предвоспалительному состоянию, которое характеризуется

выходом медиаторов воспаления в окружающую среду. Данные медиаторы могут вовлекать в процесс другие клетки (например, фибробласты, синтезирующие коллаген) или вызывать повреждение ДНК и мутации пролиферирующих клеток, что через некоторое время может стать причиной развития опухоли (Balkwill, Mantovani, 2001).

УНТ имеют ворсоподобную форму, и, если говорить об ОУНТ, они гибки и часто спутаны в клубок. Такие переплетения хотя и имеют размер частицы, не подчиняются закономерностям токсичности волокнистых материалов из-за своей неволокнутой геометрии (Donaldson et al., 2010; Kane, Hurt, 2008). МУНТ, с другой стороны, гораздо жестче и, как правило, менее спутаны; таким образом, если они достаточно длинны, они могут представлять риск для здоровья, как это было продемонстрировано в исследовании Дональдсона с соавторами (Donaldson et al., 2010).

Работа группы, под руководством Рима-Расмуссена (Ryman-Rasmussen et al., 2009), проведенная в 2009 году на никельсодержащих измельченных МУНТ длиной от 100 нм до 10 мкм, взвешенных в плюрониловом геле, показала, что нанотрубки обнаруживались внутри макрофагов субплевральной ткани после однократной 6-часовой ингаляционной экспозиции в дозировке 30 мг/м^3 . Фиброзные повреждения, которые усиливались через 2 и 6 недель после экспозиции, оставались фокальными и регионарными. Этот эффект не наблюдался после воздействия в дозировке 1 мг/м^3 , что, согласно расчетам авторов, соответствует $0,2 \text{ мг/кг}$. Авторы не обнаружили содержащих МУНТ макрофагов внутри плевры, но они заметили повышенное число плевральных мононуклеарных клеток.

Исследование Портера с соавторами (Porter et al., 2010), опубликованное примерно в то же время, сообщало, что МУНТ могут достигать плевры после фарингеальной аспирации. Воспаление распространялось на легкие и плевру у половины мышей, подвергавшихся воздействию МУНТ. Через 56 дней после экспозиции МУНТ проникали сквозь плевру у двух из четырех мышей, получивших наибольшую дозу МУНТ. Воспаление, вызванное нанотрубками, при низких дозировках имело временный характер, тогда как при дозе 40 мкг воспаление наблюдалось и через 56 дней.

В другой работе, опубликованной исследователями той же группы (Mercer et al., 2010), сообщается об изначально высокой плотности проникновений в суб-плевральную ткань на следующий день после вдыхания МУНТ (80 мкг на мышь). Кинетика проникновения снижалась к 7-му дню благодаря поглощению альвеолярными макрофагами и достигала равномерного уровня в субплевральной ткани и во внутриплевральной зоне в период с 28 по 56 день. Большинство трубок (62% дозы) осело в альвеолярных макрофагах, в то время как 0,6 % трубок достигли области висцеральной плевры (субплевра и плевральная полость).

Как подчеркивает один из основоположников нанотоксикологии Кен Дональдсон (Donaldson et al., 2010), ключевой вопрос, который необходимо задавать, имея дело со связью любых волокон с мезотелиомой, это не «достигают ли волокна плевры?», а «остаются ли волокна в париетальной плевре?», так как именно это является предпосылкой к развитию плевральной мезотелиомы.

Когда длинные и короткие УНТ (аналогично длинным и коротким асбестовым волокнам) вводились в плевральную полость напрямую, авторы работы (Murphy et al., 2011) обнаружили связь воспаления с длиной. В ответ на введение коротких трубок (волокон) не возникало практически никакого заметного воспаления. Короткие волокна не были обнаружены ни на 1, ни на 7 день; мезотелий, утолщение которого наблюдалось на 1-й день, восстановил свои обычные характеристики на 7-й день. Исследователи связывают это с тем, что короткие трубки и волокна выносились из плевры через каналы лимфатической системы, длинные трубки и волокна оставались внутри плевры вблизи лимфатических протоков, вызывая воспаление и прогрессирующий фиброз.

В то время как исследования легочной токсичности явно указывают на то, что вдыхание УНТ представляет собой угрозу здоровью на рабочем месте, токсичность УНТ после введения *in vivo* методами, актуальными для биомедицины, все ещё до конца не установлена. Среди различных путей введения, интраперитонеальный путь имеет несколько преимуществ. Во-первых, он позволяет вводить более значительные дозы суспензий НЧ, во-вторых, брюшная полость обладает хорошо известным механизмом

избавления от частиц. Частицы, покидающие брюшную полость, проникают по ретростернальному (загрудинному) пути через пороподобные структуры (stomata) в средостенные лимфатические узлы и по ним – в верхний грудной лимфатический проток или в правый лимфатический проток (Abu-Hijleh et al., 1995). Более того, брюшная полость и расположенные в ней органы, покрытые мезотелием, считаются удобным аналогом мезотелия плевральной полости в исследованиях токсичности волокнистых материалов, как отмечается в работе (Donaldson et al., 2010).

Исследование *in vivo* токсичности УНТ при внутрибрюшинном введении было проведено в работе Хартмана с соавторами (Hartman et al., 2007). Было проведено сравнение острой токсичности длинных и ультракоротких УНТ в виде суспензии в водном растворе Tween 80. Установлено, что вне зависимости от длины частиц вводимого материала, агрегаты УНТ вызывают грануломатозную реакцию внутри органов подобную той, что наблюдается в легких после вдыхания или интратрахеального введения (Hartman et al., 2007).

Позже, в сравнительном исследовании МУНТ и волокон асбеста проведенной группой под руководством Полланда (Poland et al., 2008) было отмечено, что патогенность МУНТ проявляется в зависимости от их длины, включая формирование грануломы и воспаления. Для оценки роли длины волокон, использовали образцы длинных и коротких асбестовых волокон и МУНТ. Частицы с длинами менее 5 мкм и 20 мкм считались короткими, спутанными МУНТ; в то время как длинные трубки имели среднюю длину 13 мкм (24% трубок были длинее 15 мкм) и, максимум, 56 мкм. Готовили суспензию частиц в альбумине сыворотки бычьей крови с физраствором, полученный препарат вводился мышам интраперитонеально в дозировке 50 мкг на мыш. Образцы МУНТ различались по производителю и методам производства и очистки (короткие очищались кислотой). Через 7 дней после введения авторы (Poland et al., 2008) отмечали, что только образцы, содержавшие длинные волокна (как асбеста, так и МУНТ) вызывали значительную полиморфно-нуклеарную лейкоцитарную инфильтрацию, экссудацию протеина и грануломы. Тем не менее, мезотелиальный слой плевральной стороны диафрагмы оставался нормальным во всех случаях, а

воспаление уменьшилось к 7-му дню. Короткие волокна (как асбеста, так и МУНТ) не вызывали значительного воспаления ни на 1-й, ни на 7-й день после введения, кроме одной из трех мышей, принадлежавших к группе, получавшей короткие спутанные МУНТ длиной < 20 мкм. Из исследования можно сделать общий вывод о том, что короткие МУНТ ведут себя не так, как длинные волокна асбеста, но полученные данные не дают основания исключить возможность того, что короткие МУНТ могут действовать согласно какому-то другому механизму, не раскрытому в данном исследовании. Длинные МУНТ вызывали появление очагов воспаления, инородных тел и гранулом, качественно и количественно схожих с теми, которые возникают под действием длинных волокон асбеста. В варианте с животными, получавшими короткие МУНТ, также отмечалось развитие гранулом, однако авторы предположили, что имело место загрязнение образцов более длинными волокнами, либо грануломы могли развиваться случайно (Poland et al., 2008).

В исследовании (Kolosnjaj-Tabi et al., 2010) ультракороткие (20-80 нм длиной) и длинные ОУНТ разведенные в Tween вводили мышам в дозах до 1000 мг/кг. Было установлено, что вне зависимости от введенной дозы (50-1000 мг/кг массы тела), длины или состояния поверхности используемого материала, крупные агрегаты УНТ (>10 мкм) вызывали необратимое формирование гранулом (Рис. 19).

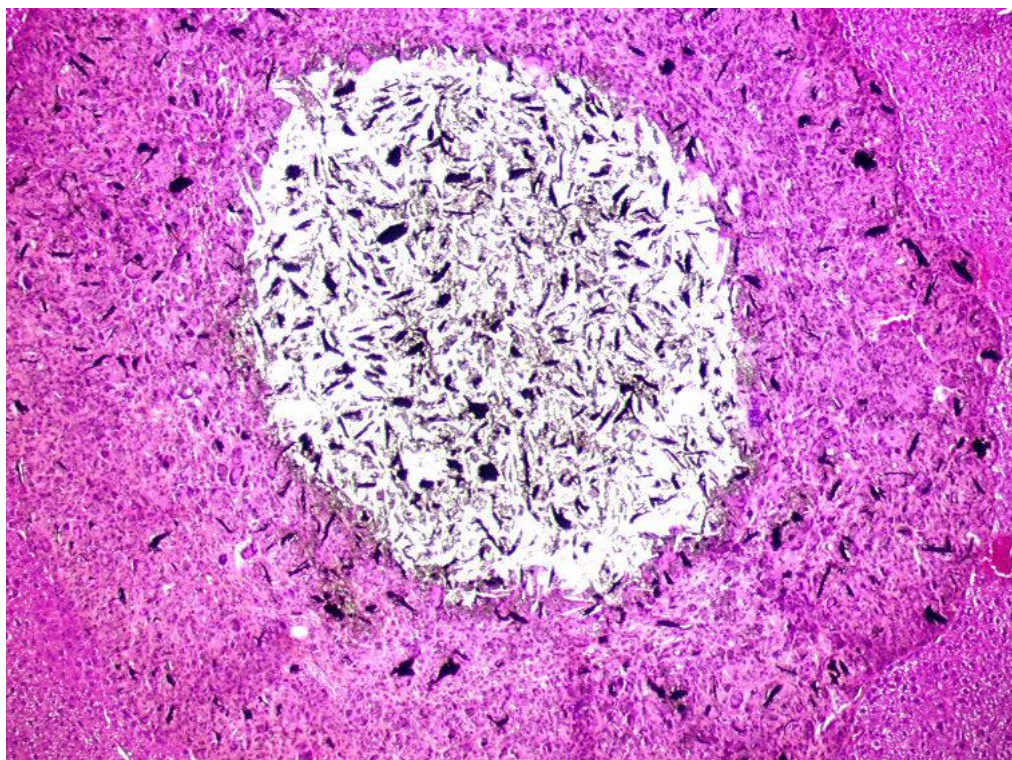


Рисунок 19 – Оптическая микрофотография препарата печени мыши, окрашенного гематоксилином-эозином после интраперитонеального введения одной дозы ультракоротких ОУНТ через 90 дней после введения, демонстрирующая гранулому, перегруженную ультракороткими трубками, увеличение x10 (по Kolosnjaj-Tabi et al., 2010)

Использование высоких дозировок определялось необходимостью поддерживать достаточную постоянную концентрацию материала в организме. Применение болюсной дозы приводило к образованию гранул, сформировавшихся после агрегации интраперитонеально введенных УНТ. Более мелкие агломераты (< 300 нм), с другой стороны, не вызывали грануломы, в условиях данного эксперимента они также не вызывали никаких других угрожающих жизни изменений. Значительная часть хорошо диспергированных УНТ выводилась через почки и желчевыводящие пути. Тем не менее, агрегированная часть введенной дозы не удалялась из организма и наблюдалась внутри клеток и через 5 мес. после введения (Рис. 20).

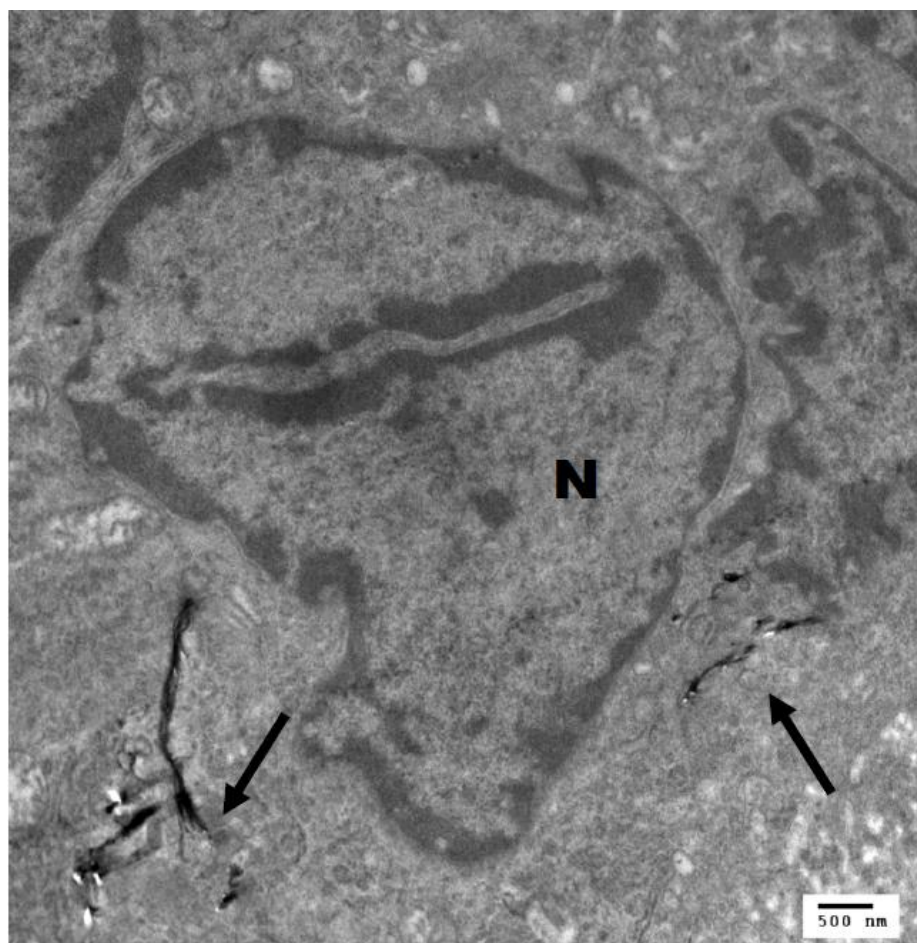


Рисунок 20 – Электронная микрофотография, демонстрирующая клубки ОУНТ в клетке Купфера, обнаруженные в печени мыши через 5 мес. после введения материала, масштабная линейка 500 нм (по Kolosnjaj-Tabi et al., 2010)

Постоянство присутствия агрегатов нанотрубок внутри клеток может быть, вероятно, объяснено медленной скоростью дезагрегации и выведения более крупных агрегатов.

Исследование воздействия ОУНТ при внутривенном введении мышам (3 мг/кг) с последующим наблюдением (более 4 месяцев), показали неизменную химическую картину крови и нормальные показатели при гистологическом исследовании (3 мг/кг) (Schipper et al., 2008). У животных не отмечено значительных воспалительных повреждений, а рамановская спектроскопия не показала аккумуляции ОУНТ в печени и селезенке. В этом исследовании использовались УНТ, сильно диспергированные в

полиэтиленгликоле (PEG). Перед введением материала животным агрегаты УНТ удалялись при помощи ультрацентрифугирования.

Коллективом авторов во главе с Лю (Liu et al., 2008) были исследованы сильно диспергированные нативные ОУНТ с различными пегилированными фосфолипидами. Крупные клубки и загрязнения удалялись при помощи центрифугирования, а суспензия из единичных трубок или небольших клубков вводилась внутривенно в дозах примерно по 20 мкг или 100 мкг на мышь. Распределение в крови, тканях и органах, также как и выведение с мочой и фекалиями, оценивались с помощью рамановской спектроскопии по измерению мода поперечного графитоподобного фонона (диапазон D). Введенные ОУНТ, в основном, аккумулировались в печени и селезенке, тем не менее, их количество снижалось на протяжении трехмесячного периода. Авторы заключили, что ОУНТ выводились, в основном, по билиарному пути; лишь небольшое количество коротких трубок (длиной < 50 нм) выводилось с мочой. В результате был сделан вывод об отсутствии существенных признаков токсичности.

Янг с соавторами (Yang et al., 2008) также отмечали низкое токсическое воздействие ОУНТ на мышей в течение трехмесячного периода. Эксперимент при этом состоял в следующем: готовили суспензию очищенных ОУНТ в 1% водном растворе Tween 80, суспензию диспергировали ультразвуком в течение 30 минут и вводили мышам в различных дозах, от 40 мкг до 1 мг на животное. Через 90 дней после экспозиции некоторые биохимические параметры сыворотки (ALT, AST и LDH) у получавших ОУНТ животных были выше, чем в контрольной группе, что указывает на дозозависимость проявляющихся поражений печени и отторжения тканей. Долговременное аккумулирование агрегированных ОУНТ было зарегистрировано на гистологических препаратах легких, печени и селезенки, и подтверждалось рамановской спектроскопией и трансмиссионной электронной микроскопией лизатов органов. Тем не менее, случаи фиброза органов отмечены не были.

В последнее время появились сообщения об эмбриотоксическом эффекте, вызванном внутривенным введением ОУНТ мышам (30 мкг на мышь) (Pietrojusti et al., 2011). Авторы использовали нативные, окисленные и ультра-окисленные при помощи кислоты ОУНТ.

Кобальт был единственным загрязнением, попадавшим в среду, в которой диспергировались трубки. До окончания беременности животные усыплялись и матка, плацента и эмбрионы подвергались исследованию. У самок, получавших окисленные ОУНТ, наблюдался высокий процент ранних выкидышей и эмбриональных уродств, в то время как у животных, получавших не измененные ОУНТ, регистрировалось значительно меньше случаев подобных нарушений. Самой низкой эффективной дозой была доза 100 нг/мышь. В плацентах деформированных эмбрионов наблюдались обширные васкулярные поражения и повышенное производство активных форм кислорода, при этом данные изменения не регистрировались в плацентах нормальных эмбрионов. В деформированных эмбрионах были отмечены повышенные уровни продукции активных форм кислорода (АФК). В материнских тканях уровень АФК не повышался и никаких явных морфологических изменений не наблюдалось (Pietrojusti et al., 2011).

Стоит отметить, что работ, посвященных исследованию воздействия УНТ на млекопитающих при пероральном введении, практически не встречается.

1.3 Нормативно-правовое регулирование в сфере безопасности нанотехнологий

Деятельность, связанная с решением проблем определения уровня безопасности НТ и НМ для животных, человека и окружающей среды, интенсивно развивается во многих странах. Рабочая группа по промышленным НМ при Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) является одной из международных организаций, занимающихся координацией работ по безопасности применения НМ. В выполнении межгосударственной программы по выявлению потенциальной опасности НЧ принимают участие Австралия, Бельгия, Канада, Чешская республика, Дания, Франция, Германия, Ирландия, Италия, Япония, Корея, Нидерланды, Новая Зеландия, Норвегия, Испания, Швеция, Великобритания,

США, Китай, Таиланд. В большинстве этих стран ведутся работы по мониторингу содержания НМ в окружающей среде, выявлению потенциальной токсичности для живых организмов, изучению социальных и экономических аспектов НТ. В США в 2000 г. была обнародована Национальная нанотехнологическая инициатива (The National Nanotechnology Initiative – NNI), координирующая нанотехнологическую активность 26 федеральных агентств (National Nanotechnology... 2000). Эта межведомственная программа, среди прочего, предусматривает, оценку опасных для здоровья людей химических агентов на основе использования современных токсикологических тестов. В рамках этой программы 6 федеральными агентствами США ведется изучение потенциального риска применения НМ для здоровья человека. Одна из основных задач данных исследований – разработка нормативной и методической базы для оценки безопасности производства и использования нанопродуктов. Участниками программы является ряд ведущих государственных организаций США и такие известные фирмы, как BASF, DuPont и др. Национальный институт гигиены окружающей среды (National Institute of Environmental Health Sciences – NIEHS) занимается изучением действия промышленных НТ на здоровье человека. NIEHS возглавляет Национальную токсикологическую программу (National Toxicology Program, NTP), в которой задействованы многие институты и агентства, а также участвует в исследованиях по токсикологической оценке специфических инженерных НМ. Американское агентство по охране окружающей среды (Environmental Protection Agency - EPA) проводит исследования экологической безопасности продуктов, созданных с использованием НМ. В первую очередь это касается изделий, содержащих в своем составе НЧ серебра, обладающие антимикробным действием. В 2006 г. создана Специальная внутренняя комиссия FDA по нанотехнологии (FDA Nanotechnology Task Force) для оценки безопасности продуктов, содержащих НМ (Policy Brief...2007; Report of... 2010; Regulatory Aspects... 2008; Meeting of... 2011; Congressional Record... 2010).

В Евросоюзе в 2004 г. была принята Европейская стратегия в области НТ, в которой было указано на необходимость оценки потенциальной опасности НТ для здоровья человека и окружающей среды. Позже Научным комитетом - The Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) – проводились открытые консультации для выработки рекомендаций по оценке этого риска. После проведенных консультаций SCENIHR был опубликован отчет о возможности применения уже существующих методологий для оценки потенциальной опасности нанопродуктов.

Страны, входящие в Евросоюз и другие международные сообщества, используют национальное законодательство, основанное или полностью повторяющее стандарты ISO (International Standard Organization) (79). Эти стандарты разрабатываются крупнейшими и авторитетнейшими научно – исследовательскими организациями мира (в частности NIST – National Institute of Standards and Technology, USA – Национальный институт стандартов и технологий, США) и проходят сначала многократные обсуждения, согласования и апробации, на что уходит несколько лет, а затем принимаются в качестве утвержденного и юридически обязывающего подписанного документа. Для принятия стандарта необходимо согласие не менее чем 75% стран – участников, входящих в сообщество. Организационную работу в этом направлении проводит специально созданный Технический комитет по НТ, имеющий наименование ТС – 229.

В настоящее время принят ряд стандартов ISO, касающихся обеспечения безопасности НТ и НМ:

- ISO 10801:2010 – Nanotechnologies – Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method (Нанотехнологии – Генерирование/синтез наночастиц, использующее метод испарения/конденсации вещества);

- ISO 10808:2010 – Nanotechnologies – Characterization of nanoparticles inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing – Характеризация

(оценка свойств) наночастиц в камере для ингаляционного экспонирования в целях тестирования ингаляционной токсичности;

- ISO 29701:2010 – Nanotechnologies – Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems – Limulus amoebocyte lysate (LAL) test – Нанотехнологии – эндотоксикологический тест на образцах наноматериалов в условиях in vitro – тест на лизате амёб Limulus;

- ISO/TR 11360:2010 – Nanotechnologies – Methodology for the classification and categorization of nanomaterials – Нанотехнологии – Методология для классификации и систематизации наноматериалов;

- ISO/TR 12802:2010 – Nanotechnologies – Model taxonomic framework for use in developing vocabularies – Core concepts – Нанотехнологии – Модельная таксонометрическая структура для использования в развивающихся словарях – основные понятия и концепции;

- ISO/TR 12885:2008 – Nanotechnologies – Health and safety practices in occupational settings relevant to nanotechnologies – Нанотехнологии – здоровье и техника безопасности на рабочих местах применительно к нанотехнологиям;

- ISO/TR 13121: 2011 – Nanotechnologies – Nanomaterial risk evaluation – Нанотехнологии – Оценка рисков применения наноматериалов;

- ISO/TS 80004 – 1:2010 – Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms – Нанотехнологии – словарь терминов, часть 1: основные термины;

- ISO/TS 80004 – 3:2010 – Vocabulary – part 3: Carbon nano – objects – Словарь; часть 3: углеродные нанообъекты;

- ISO/TS 10798:2011 – Nanotechnologies – Characterization of single-wall carbon nanotubes using scanning electron microscopy and dispersive X-ray spectrometry analysis – Нанотехнологии – характеристика одностенных углеродных нанотрубок с помощью сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского микроанализа;

- ISO/TS 10867:2010 – Nanotechnologies – Characterization of single-wall carbon nanotubes using near infrared photoluminescence spectroscopy –

Нанотехнологии – Характеризация одностенных углеродных нанотрубок с помощью инфракрасной фотолюминесцентной спектроскопии;

- ISO/TS 10868:2011 – Nanotechnologies – Characterization of single-wall carbon nanotubes using ultraviolet – visible – near infrared (UV – Vis – NIR) absorption spectroscopy – Нанотехнологии – Характеризация одностенных углеродных нанотрубок на основе использования абсорбционной оптической спектроскопии в широком диапазоне длин волн – от ультрафиолета до ближнего инфракрасного;

- ISO/TS 11251:2010 – Nanotechnologies – Characterization of volatile components in single – wall carbon nanotube samples using evolved gas analysis/gas chromatograph – mass spectroscopy – Нанотехнологии – характеризация летучих компонентов в одностенных углеродных нанотрубках с помощью газового анализа методами газовой хроматографии и масс – спектрометрии;

- ISO/TS 27687:2008 – Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano – objects – Nanoparticles, nanofiber and nanoplate – Нанотехнологии – Терминология и определения для нанообъектов – наночастицы, нановолокна и нанопластины;

- ISO/TR 12885:2008(E) – Нанотехнологии – здоровье и техника безопасности;

- ISO/TR 13121 – Нанотехнологии – Оценка рисков контакта с наноматериалами.

Кроме того, вопросами нормативного регулирования в области безопасности НТ занимаются такие международные и национальные организации, как Международный Совет управления рисками (International Risk Governance Council, IRGC), Агентство защиты окружающей среды США (Environmental Protection Agency - EPA), Агентство контроля и регулирования пищевых продуктов и лекарств США (Food and Drug Administration - FDA), Агентство по контролю за химической продукцией (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances (REACH), подкомитет

экспертов по глобальной гармонизации системы классификации и маркировки химикатов (Sub-Committee of Experts on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) Комитета экспертов по транспортировке опасных грузов и по глобальной гармонизации системы классификации и маркировки химикатов (Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods and on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) Секретариата ООН, Комиссия Европейских Комитетов (Commission of the European Communities) и т.д. (Congressional Record... 2010; Grens, 2006; Harber et al., 2010; Jiang et al., 2009; Monica, Jr., 2010; Montes-Burgos et al., 2010; Ostrowski et al., 2009; Ren et al., 2010; Tervonen et al., 2009; <mailto:mail@the-scientist.com>; <http://www.nas.edu/nrc/>; <http://www.nano.gov/>; <http://www.the-scientist.com/>; <http://www.nap.edu/>; <http://www.matsceng.ohio-state.edu/>; <http://www.nsti.org/>; <http://www.wilsoncenter.org/>; Singh, 2007; <http://www.irgc.org/>; <http://www.innovationsgesellschaft.ch/>; <http://www.swissre.com/>).

Этими организациями в свою очередь разработан ряд документов в области обеспечения безопасности наноиндустрии и ее продукции:

- Recommendations for a global, coordinated approach to the governance of potential risks – Рекомендации по глобальному, скоординированному подходу к управлению потенциальными рисками»;

- Regulatory Aspects of nanomaterials – Регулирование в области производства и потребления наноматериалов;

- Nanotechnology Safety Act of 2010 – Нанотехнологический Акт Безопасности от 2010 г.

- Nanotechnology Law Report – Отчет по законотворчеству в сфере нанотехнологий и др.

В Японии ведутся активные исследования по оценке потенциальных рисков, связанных с производимыми НМ. Работа фокусируется на подготовке протоколов тестов по определению токсичности (главным образом,

определение токсичности при вдыхании) и методологии оценки риска, связанного с производством НМ.

В Китае разработан ряд Национальных стандартов, касающихся терминологии (GB/T19619-2004); измерения частиц (GB/T13221-2004, GB/T19587-2004; GB/T19627-2005) и спецификации НМ (GB/T19588-2004 - GB/T19591-2004).

В России к настоящему времени создана достаточно серьезная нормативная база в области безопасности НТ (Постановление Главного... 2007а; Постановление Главного ...2007б; Приказ Роспотребнадзора...2007; Концепция участия ...2008; Федеральный закон...1999; Федеральный закон... 2000; Федеральный закон...2008)

В 2007 г. была утверждена «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов», разработанная Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека совместно с ведущими научными центрами и НИИ РАМН, Минобрнауки РФ и Роспотребнадзора.

Исследования влияния НМ на организм человека, деградации НЧ при взаимодействии с биологическими объектами, их влиянии на метаболические процессы в живых организмах, а также разработка методов, позволяющих получать эту информацию, являются в настоящее время весьма важными и актуальными задачами.

В качестве индикатора, отражающего воздействие НМ, может служить состояние системы антиоксидантной защиты организма и процессов деградации клеток. Использование методов исследования окислительного (оксидантного) стресса и антиоксидантной защиты организма как интегрального показателя биологических объектов может стать основным инструментом диагностики и оценки безопасности НТ.

Исследования по безопасности НМ России координируются Роспотребнадзором в рамках «Концепции токсикологических исследований,

методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

Основополагающими нормативно-правовыми актами, регулирующими безопасность нанотехнологий в Российской Федерации, являются:

1. Федеральный закон Российской Федерации от 30 марта 1999 года № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Федеральный закон Российской Федерации от 02 января 2000 года № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».
3. Федеральный закон Российской Федерации от 27 декабря 2002 года № 184-ФЗ «О техническом регулировании».
4. Федеральный закон Российской Федерации от 10.01.2002 года № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».
5. Федеральный закон от 27.06.2011 г. №164-ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях».
6. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 года № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».
7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 года № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».
8. Приказ Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08.2010 года «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 № 18713).
9. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 12 октября 2007 г. N 280 «Об утверждении и внедрении методических рекомендаций «Оценка безопасности наноматериалов».
10. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 года № 54 «О надзоре за продукцией,

полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».

11. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

12. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

13. Проект: «Разработка методологии и создание средств контроля для оценки безопасности действия наноматериалов на аппарат наследственности».

14. МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

15. МР 1.2.2522-09 Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

16. Временные гигиенические нормативы от 15.03.2010 «Гигиенический контроль при работе с наноматериалами искусственного происхождения».

17. МР 1.2.2641-10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах».

18. МР 1.2.2640-10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов».

19. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 7.07.2011 №1192-р «Категории продукции наноиндустрии в части товаров и услуг» и др.

Указанные документы предполагают внедрение единого, научно обоснованного, стандартизированного количественного подхода к оценке безопасности искусственных НМ. Согласно изложенным в них положениям, для токсикологических характеристик необходимо оценить потенциальные пути проникновения в организм, токсичность, кумулятивное действие, местнораздражающее действие, отдаленные эффекты, иммунотоксичность, аллергенность, накопление в органах и тканях, проницаемость барьеров организма для токсикантов и НМ.

Можно заключить, что в области нормативно-правового обеспечения безопасности НТ Российская Федерация, возможно, находится впереди государств-лидеров нанотехнологической отрасли. В то же время, стоит отметить, что официальных документов, регламентирующих порядок комплексной экотоксикологической оценки НМ пока не появилось. Соответственно, отсутствуют нормативы по содержанию НЧ, включая УНМ, в природных средах, что вызывает озабоченность, с учетом имеющихся токсикологических данных.

Таким образом, вслед за быстро развивающейся НТ отраслью в последние годы активно формируется новое научное направление – нанотоксикология, имеющая дело с изучением взаимодействия наноструктур с биологическими системами. Основной акцент делается на объяснение связи между физическими и химическими свойствами НМ (такими, как размер, форма, свойства их поверхности, состав и степень агрегации) с индукцией токсического ответа у биологических структур.

Новая дисциплина уже достигла определенных успехов – междисциплинарные коллективы, задействованные в исследованиях, способны получить результаты, недоступные группам узких специалистов. Ежегодный рост числа нанотоксикологических публикаций в авторитетных научных изданиях служит этому подтверждением.

В то же время, экологическая безопасность НМ, несмотря на очевидную научную и практическую значимость, судя по количеству

исследований и степени методической обеспеченности находятся в стадии становления. Возникает необходимость разработки комплекса количественных методов оценки токсического воздействия НЧ на биообъекты различных систематических и эколого-функциональных групп. Это поможет в будущем избежать появления противоречивых данных и ускорит процесс экологической экспертизы и безопасного внедрения вновь создаваемых наноструктурных материалов.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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 и сканирующей электронной микроскопии установлено, что диаметр нанотрубок составляет $11 \div 28$ нм, длина – $5 \div 10$ мкм; расстояние между слоями атомов углерода в нанотрубках около 0,25 нм. МУНТ образуют агломераты размером от 1 до 1000 мкм со структурой спутанных пучков многостенных углеродных нанотрубок (Рис. 21). Данный материал синтезируется методом газофазного химического осаждения (так называемый ГФХО или CVD-процесс) путём каталитического пиролиза углеводородов. Его крупнотоннажное производство освоено ООО «НаноТехЦентр» в г. Тамбове.

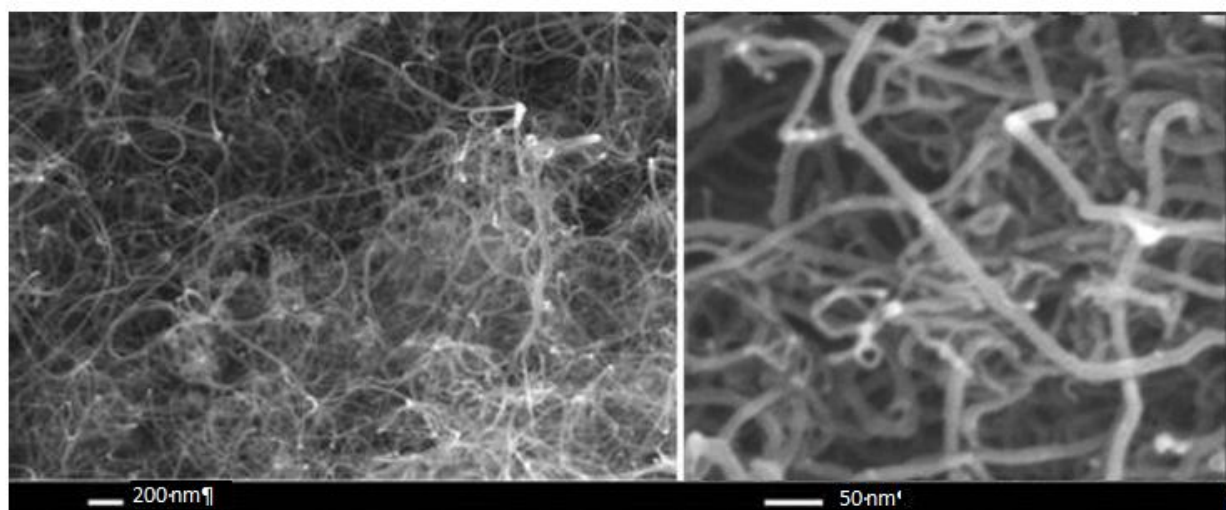


Рисунок 21 – Электронномикроскопическое изображение морфологической структуры исследуемого УНМ (масштабные линейки 200 и 50 нм)

Производимые ООО «НаноТехЦентр» МУНТ по данным разработчиков перспективны для медицины, фармацевтики, создания фильтров широкого

назначения, а также производства целого ряда конструкционных и функциональных материалов для различных отраслей промышленности (Мищенко, Ткачѳв, 2008).

Прочие результаты исследования УНМ приведены в разделе 3.

2.2 Методики исследований

2.2.1 Электронно-микроскопические исследования МУНТ

Анализ исходных МУНТ проводили методом ПЭМ с исследованием дифракции электронов с помощью просвечивающих электронных микроскопов 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).

2.2.2 Определение концентрации наночастиц в атмосфере

Экспериментальные исследования по аппаратному анализу проб воздуха в производственных помещениях объекта наноиндустрии и непромышленной (бытовой) зоне, проводились с помощью спектрометра-классификатора частиц с высокой мобильностью FMPS модель 3091 (TSI, США). Данный спектрометр классифицирует гранулометрический состав аэрозолей на основании дифференциальной электрической классификации мобильности с использованием сканирующей системы-классификатора мобильных частиц SMPS). Принцип работы спектрометра состоит в следующем: электрически заряженный аэрозоль поступает в колонку анализатора рядом с его центральной осью над центральным электродом. Частицы радиально отходят от него и собираются на электрически изолированных электродах, которые находятся у наружной стенки. Числовая концентрация частиц определяется измерением электрического тока,

собранного на серии электродов. Размер анализируемых частиц варьирует от 5,6 до 560 нм, концентрация от 10^3 до 10^9 шт./см³.

Измерения содержания НЧ в атмосферном воздухе проводились последовательно в непромышленном помещении на территории НОЦ «Нанотехнологии и наноматериалы» ТГУ им. Г.Р. Державина (контроль) и в цеху ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец» им. Н.С. Артемова» в зоне производства углеродных наноматериалов (эксперимент).

Аэрозольный спектрометр размещался на полу. Расстояние от спектрометра до действующей установки по производству УНМ составляло 5 м. Период измерений составлял 10 мин, повторность – 3-х кратная.

2.2.3 Получение водных дисперсий на основе многостенных углеродных нанотрубок.

Выбор способа диспергирования НМ в воде, а также оптимального режима, обеспечивающего получение стабильных коллоидных растворов с последующим контролем их качества, осуществлялись в соответствии с данными предварительно проведенных экспериментов по диспергированию. Для определения оптимального режима обработки, МУНТ и сажу диспергировали в дистиллированной воде при помощи ультразвуковой обработки, продолжительность гомогенизации – до 10 минут, мощность – 300 Вт, частота – 23 кГц с помощью ультразвукового диспергатора Hielscher UIP1000hd (Hielscher Ultrasonics, Германия). В качестве механического диспергатора использовался гомогенизатор-диспергатор ИКА MagicLab МК (ИКА Werke, Германия). Скорость гомогенизатора-диспергатора при изготовлении суспензий углеродных НЧ с использованием механических воздействий, составляла 20000 об/мин, давление 2,5 бар, время обработки 5 и 10 минут. Дистиллированную воду для контрольных экспериментов обрабатывали аналогичным образом без добавления МУНТ.

Степень диспергирования и ζ -потенциал НЧ анализировали с использованием метода динамического рассеяния света (ДРС), (DLS –

Dinamic light scattering), также известного как фотонная корреляционная спектроскопия (PCS – Photon correlation spectroscopy). Измерения проводили с помощью прибора ZetasizerNano (Malvern, Великобритания). В экологических экспериментах использовались коллоидные растворы, разведенные до концентраций 1 мг/л – 10 г/л.

2.2.4 Концептуальное моделирование уровня потенциальной опасности наноматериала

Исследуемый УНМ классифицировался, согласно рекомендациям Роспотребнадзора (Методические рекомендации... 2009а), с использованием генеральных определительных таблиц (ГОТ), представляющих собой перечень признаков НМ, сгруппированных по функциональным блокам, и упорядоченных по значимости. В ГОТ использовались 25 признаков в шести функциональных блоках, отражающих важнейшие характеристики материала. Расчёт «частной» опасности НМ по отдельному функциональному блоку свойств 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 таблице 2 представлены значения показателя опасности D.

Таблица 2–Значения показателя опасности D

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

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 проводится в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Значения коэффициента неполноты оценки опасности U

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

2.2.5 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на выживаемость бактерий *E. coli* и *B. cereus*.

Для оценки воздействия МУНТ на бактерии, в качестве тест-объектов использовались культуры клеток *E. coli* K12 и *B. cereus*.

Кишечная палочка (*Escherichia coli*) – вид грамотрицательных палочковидных бактерий. Принадлежат к семейству *Enterobacteriaceae*, род *Escherichia* (Эшерихия), впервые были описаны немецким ученым Эшерихом (Т. Escherich) в 1885 году. Представляют собой полиморфные подвижные и неподвижные палочковидные клетки со слегка закругленными концами длиной 1-3 мкм, ширина обычно составляет 0,5-0,8 мкм. Спор не образуют. На данный момент *E. coli* является одним из самых изученных прокариотических микроорганизмов и одним из самых важных объектов биотехнологии и микробиологии.

Большинство штаммов *E. coli* являются безвредными, однако серотип O157:H7 может вызывать тяжёлые пищевые отравления у людей (Vogt, Dippold, 2005). Безвредные штаммы являются частью нормальной флоры кишечника человека и животных (Bentley, Meganathan, 1982; Reid et al., 2001).

Легко культивируемая в лабораторных условиях кишечная палочка является распространенным тест-объектом в различных исследованиях, включая экотоксикологические.

Эксперименты с *E. coli* проводили с учётом рекомендаций Роспотребнадзора (Методические рекомендации... 2009b). В качестве контроля использовали культуру *E. coli* взвешенную в дистиллированной воде в концентрации 1 единица по Макфарланду, что примерно соответствует 3×10^8 КОЕ/см³. Смешивали 1,0 см³ взвеси 3×10^8 КОЕ/см³ и 1,0 см³ дистиллированной воды, при этом получая концентрацию взвеси $1,5 \times 10^8$ КОЕ/см³. Из этой взвеси делали высев на питательный агар методом штриховой разводки, инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Из этой взвеси делали высев на питательный агар методом штриховой разводки, инкубировали при 37⁰С 24 часа. Путем расчета по стандартной таблице

(Isenberg et al., 1985) вычисляли количество клеток *E. coli*. В эксперименте смешивали 1,0 см³ взвеси 3×10⁸ КОЕ/см³ *E. coli* и 1,0 см³ коллоидного водного раствора НМ в концентрациях 10 г/л, 1 г/л, 100 мг/л, 10 мг/л и 1 мг/л в 5 пробирках в трёхкратной повторности, делали высев на питательный агар методом штриховой разводки из каждой пробирки, инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Количество клеток *E. coli* в каждой пробирке вычисляли путем расчета по стандартной таблице.

Bacillus cereus – подвижные (жгутиковые), спорообразующие, палочковидные бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*. Являются сапрофитами, широко распространены в природе и легко обнаруживаются в почве (Vilain et al., 2006). Клетки имеют тенденцию располагаться в виде цепочек, от стабильности которых во многом зависит форма колонии, - она сильно варьирует у различных штаммов. Образуют споры эллипсоидной формы, которые располагаются центрально, но не расширяют клетки.

Эксперименты с *B. cereus* проводили с учётом рекомендаций Роспотребнадзора (Методические рекомендации... 2009b). В качестве контроля использовали культуру *B. cereus* взвешенную в дистиллированной воде в концентрации 1 единица по Макфарланду, что соответствует примерно 3×10⁷ КОЕ/см³. Смешивали 1,0 см³ взвеси 3×10⁷ КОЕ/см³ и 1,0 см³ дистиллированной воды, получив концентрацию взвеси 5×10⁶ КОЕ/см³. Затем из этой взвеси делали высев на питательный агар методом штриховой разводки, инкубировали при 37⁰С 24 часа. Путем расчета по стандартной таблице вычисляли количество клеток *B. cereus*. В эксперименте смешивали 1,0 см³ взвеси 3×10⁸ КОЕ/см³ *B. cereus* и 1,0 см³ коллоидного водного раствора НЧ в концентрациях 10 г/л, 1 г/л, 100 мг/л, 10 мг/л и 1 мг/л в 5 пробирках в трёхкратной повторности, делали высев на питательный агар методом штриховой разводки из каждой пробирки, инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Количество клеток *B. cereus* в каждой пробирке вычисляли путем расчета по стандартной таблице.

2.2.6 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по интенсивности гашения биолюминесценции бактерий *E. coli* M-17.

Эффекты МУНТ на тест-систему «Эколюм» определяли по степени гашения биолюминесценции бактерий за 5 минут экспозиции. «Эколюм» – это биосенсоры на основе люминесцентных бактерий (*E. coli* M-17) и препаратов бактериальной люциферазы. Измеряемым параметром является биолюминесценция в видимой области спектра. Измерение интенсивности биолюминесценции, определение эффективных полулетальной (EC_{50}) и безвредной (EC_{20}) концентраций осуществляли с помощью прибора «Биотокс-10» с учетом рекомендаций Росприроднадзора (Методика определения... 2004). Класс опасности определялся по кратности разведения водной вытяжки, при которой не было выявлено воздействия на тест-объекты в соответствии с установленными критериями (Табл. 4).

Таблица 4 – Критерии отнесения к классам опасности (по Приказу Министерства... 2001)

| Класс опасности | Кратность разведения водного раствора |
|-----------------|---------------------------------------|
| I | > 10000 |
| II | от 10000 до 1001 |
| III | от 1000 до 101 |
| IV | < 100 |
| V | 1 |

2.2.7 Оценка экотоксичности многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости цериодафний *C. affinis*

Цериодафнии (*Ceriodaphnia affinis*) – низшие ракообразные, отряд ветвистоусых (*Cladocera*), семейство дафнид (*Daphniidae*) род цериодафний (*Ceriodaphnia*). Этот вид относится к олиго- и β -мезосапробам и населяет водные объекты с замедленным течением – неглубокие озера, реки, водохранилища (Приказ Росрыболовства... 2009).

Метод основан на установлении различия между количеством погибших цериодафний в анализируемой пробе, содержащей НЧ, и культивационной воде (Методика определения... 2007). Экспозиция – 48 часов. Расчет полумлетальных (LK_{50-48}) и безвредных (BK_{10-48}) концентраций вели с использованием пробит-анализа (Коросов, Калинкина, 2003). Класс опасности определялся аналогично п. 2.2.6.

2.2.8 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости микроскопических зеленых водорослей *Sc. quadricauda*.

В качестве тест-объекта была использована аксеничная культура микроскопической водоросли *Scenedesmus quadricauda*, относящейся к отделу *Chlorophyta*, классу *Chlorophyceae*, порядку *Chlorococcales*, семейству *Scenedesmaceae*. Хлорококковые водоросли как компоненты многих экосистем, выполняя функцию первичных продуцентов органического вещества и кислорода, принимают участие в процессах самоочищения и формирования качества воды, а представители рода *Scenedesmus*, служат биоиндикаторами трофности и сапробности водоемов (Царенко, 1990).

В основе метода лежит регистрация темпа уменьшения численности клеток водорослей (Методика определения... 2011). Устанавливались ингибирующая кратность разбавления ($ИКР_{50-72}$) и безвредная кратность разбавления ($БКР_{20-72}$) водных вытяжек, вызывающие уменьшение численности клеток водорослей соответственно на 50 % и более по сравнению с контролем и не более чем на 20%. Экспозиция – 72 часа. Значения $ИКР_{50-72}$ и $БКР_{20-72}$ рассчитывали с помощью пробит-анализа. Класс опасности определялся аналогично п. 2.2.6.

2.2.9 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок по выживаемости и цитогенетическим эффектам личинок насекомых *Ch. riparius*.

Анализировали политенные хромосомы летних личинок двукрылых насекомых – хирономид *Ch. riparius* IV возраста 7 фазы зрелости. Возраст и фазу личинок устанавливали по методике Ильинской и Иордан (Ильинская, Иордан, 1975). Личинки *Ch. riparius* («мотыль») – детритофаги, также питающиеся водными микроорганизмами, живут в придонном иле на глубине до 300 метров. Сами являются кормом для рыб. *Ch. riparius* – распространенный в экологических исследованиях объект, хорошо изученный в различных аспектах. В настоящее время он широко используется при исследовании влияния токсичных химических веществ на живые организмы (Yngersoll et al., 1990; Braner, Fisher, 1993; Postma et al., 1994; Michailova, Acad, 1985).

Показано, что загрязнения окружающей среды, вызывают структурные перестройки в политенных хромосомах личинок хирономид или индуцируют изменения в транскрипционной активности пуфов, колец Бальбиани и ядрышек (Beer mann, 1973; Diez et al., 1980).

В эксперименте использовали коллоидные водные растворы НМ в двух повторностях при экспозициях 24 ч., 48 ч., 72 ч. и 96 ч. При каждой экспозиции и концентрации исследовали по 10 личинок (по 10 клеток слюнных желез от каждой личинки). Полулетальную концентрацию ЛК₅₀ определяли методом пробит-анализа. Класс опасности определялся аналогично п. 2.2.6.

Для оценки изменений функциональной активности политенных хромосом ведущим показателем послужила реакция ядрышкового организатора (ЯО), ответственного за поддержание клеточного гомеостаза. Для фиксации личинок использована спирт-уксусная смесь (96% этанол, ледяная уксусная кислота, 3:1). Препараты политенных хромосом готовили по этилоорсеиновой методике (Дёмин, 1989) и анализировали под микроскопом при увеличении 10×40. Изменения функциональной активности политенных хромосом оценивали по индексу ЯО – отношению его

максимального диаметра к ширине интактного района хромосомы IV (Stockert, 1990). Измерение проводили с помощью программы Autodesk.

2.2.10 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на высшие растения

2.2.10.1 Характеристика используемого тест-объекта

Оценка воздействия МУНТ на высшие растения проводилась с использованием семян эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria* (Kit.) DC., 1825), сорта Розовый 89.

Выбор эспарцета в качестве тест-объекта связан с тем, что он является ценным кормовым растением, которое широко распространено в полевых и кормовых севооборотах (Ларин, 1975; Важов, 1997). Посевы эспарцета улучшают структуру почвы, а также прекрасно подходят для дальнейшей заделки зерновых и других сельскохозяйственных культур (Гладкий и др., 1971). По химическому составу эспарцет относится к лучшим кормовым растениям, дающим высокопитательный белковый корм (Ларин, Доброхотов, 1951). По данным Дульского (1954), 100 кг сена первого укоса содержит 46,2, второго – 99,7, третьего – 57,98 кормовых единиц. Дает хорошие урожаи сена (24,9–73,7 ц/га) как в чистых посевах, так и в травосмесях (Ларин, Доброхотов, 1951).

Кроме того, эспарцет песчаный – хороший медонос (Глухов, 1960). Содержит 0,07 мг нектара на один цветок, дает нектара до 90 кг/га.

Входящие в состав растения флавоны, безазотистые соединения, аскорбиновая кислота и рутин дают возможность говорить об эспарцете как о лекарственном растении. Безазотистые соединения помогают снизить уровень сахара и холестерина в крови, нормализуют деятельность желудочно-кишечного тракта, стимулируют перистальтику кишечника и улучшают всасывание питательных веществ, которые поступают вместе с пищей.

Настой и отвар травы или корней эспарцета песчаного принимают как средство, усиливающее половую активность мужчин. В смеси с другими растениями эспарцет песчаный применяют при импотенции. Аналогично используют и эспарцет сибирский, который многими ботаниками рассматривается лишь как географическая раса или подвид эспарцета песчаного.

За два года жизни эспарцета на одном гектаре накапливается 5 – 6 т органических остатков и 100 – 120 кг азота (Эспарцет...1951; Михальчук, 1953).

Таким образом, эспарцет, являясь распространенной кормовой, медоносной, а также лекарственной культурой, играющей важную роль в процессах азотфиксации в качестве модельного тест-объекта вполне может представлять высшие растения в экологических исследованиях углеродных НЧ.

2.2.10.2 Тест на прорастание семян

Оборудование, материалы, реактивы:

- весы лабораторные общего назначения, 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104–2001,
- весы лабораторные общего назначения, 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 1000 г по ГОСТ 24104–2001,
- термостат ТС–1/80 СПУ по ТУ 9452–02–00141798–97,
- ультразвуковой дезинтегратор, модель MSS 150 фирмы Sanyo,
- термометр лабораторный шкальный с диапазоном измерения от 0 до 50°C с ценой деления шкалы 0,5 °С по ГОСТ 28498–90,
- холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание ($-20 \pm 1^\circ\text{C}$) и хранение проб (от +2 до +4 °С) по ГОСТ 26678–85 с изм. от 1987 г.,
- пипетки автоматические дозаторы (любого типа) объемом 0,1 см³ и 0,2 см³ по ТУ 9452–002–33189998–2002,
- колбы мерные 2–25–2; 2–50–2; 2–100–2 по ГОСТ 1770–74,
- стаканы мерные, вместимостью 1000 см³ по ГОСТ 25336–82,
- воронки лабораторные, ВК–50 ХС по ГОСТ 25336–82,
- пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 см³ с ценой деления 0,1 см³ по ГОСТ 29227–91,
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709–72,
- вода питьевая по ГОСТ Р 51232–98,
- МУНТ,
- сажа (углерод технический) по ГОСТ 7885-86,
- семена эспарцета песчаного сорта Розовый 89,
- климатическая камера КК–300.

Подготовка посуды для биотестирования

Мерные стаканы и стеклянные воронки мыли и ополаскивали дистиллированной водой, стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение одного часа.

Подготовка семян

Предназначенные для проращивания семена предварительно прогревали при температуре 30–40°С в течение 5–7 суток в термостате.

Подготовка субстрата для проращивания семян

В качестве субстрата использовали кварцевый песок, который промывали, просеивали на ситах для получения фракции 0,5–2,0 мм, высушивали и прокаливали в сушильном шкафу при температуре 130°С в течение одного часа. Полученным песком на 2/3 заполняли растильни.

Непосредственно перед проведением работы песок увлажняли суспензиями МУНТ.

Приготовление суспензий МУНТ

Суспензии МУНТ готовили на основе дистиллированной воды. Навески МУНТ (от 1 мг до 10 г с шагом в 10 раз) взвешивали при помощи аналитических весов ViBRA HT (Shinko Denshi, Japan, точность $\pm 0,0001$ г), высыпали в предварительно приготовленную емкость с водой объёмом 1 л и перемешивали стеклянной палочкой в течение 20 секунд. После чего диспергировали при помощи ультразвука в течение 5 минут, мощности – 300 Вт, частоте – 23,740 кГц согласно разработанной нами методике пробоподготовки (раздел 2.2.3). Полученными суспензиями увлажняли песок в растильнях, в которые впоследствии высевали семена.

Процедура биотестирования

Исследования проводились в лабораторных условиях (температура воздуха в лаборатории от + 18 до 25°С, относительная влажность 80±5%, атмосферное давление 630–800 мм рт.ст.).

Культивирование семян растений осуществлялось в климатической камере КК-300 (Россия) в растильнях с песком, увлажненным различными

концентрациями МУНТ (от 1 мг/л до 10 г/л) в дистиллированной воде. Контроль – дистиллированная вода. Всего в эксперименте проращивалось 3000 семян (60 растений по 50 семян). Энергия прорастания и всхожесть определялись по ГОСТ 12038–84 на 5 и 10 день соответственно. После окончания эксперимента корни и стебли растений были измерены с точностью до 0,1 см.

2.2.10.3 Проведение микроскопических исследований

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

Фиксация материала для световой микроскопии.

Для световой микроскопии проростки фиксировали в смеси 96% спирта и уксусной кислоты (3:1) в течение 16 ч. После фиксации образцы растений переносили в 70% спирт. Затем исследуемые части растений (корень, лист) помещали на предметное стекло в каплю 45% уксусной кислоты. Приготовление тотальных препаратов различных органов растений проводили по методу Паушевой (Паушева, 1974). Готовые препараты анализировали с помощью светового микроскопа (объективы $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ и $\times 100$), для регистрации изображений использовали цифровую камеру LeicaDFC 295 (размер сенсора 3×10^6 пикселей).

Фиксация материала для электронной микроскопии.

Для детекции НЧ электронномикроскопическим методом для каждой пробы брали участки от 5 растений. Эти участки разрезали на части по 0,3–0,5 мм, для лучшего проникновения фиксатора. Фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном К–Na фосфатном буфере Зоренсена при рН=7,2–7,4 с добавлением сахарозы (0,015 г/мл). Для

фиксации одной пробы использовали пластиковые контейнеры объемом 10 мл с завинчивающейся крышкой.

Приготовление 0,1М буфера Зоренсена:

раствор (А) – 0,1М KH_2PO_4 –13,6г на 1 литр дист. H_2O – 3 части,

раствор (Б) – 0,1М Na_2HPO_4 –14,2г на 1 литр дист. H_2O –7 частей,

Приготовили смесь растворов (А) и (Б) с $\text{pH}=7,2$ –7,4.

Для заключения образцов в эпоксидную смолу необходимы следующие реактивы:

этиловый спирт 96°,

абсолютный ацетон (диметилкетон), (CH_3COCH_3 , ОСЧ 9–5),

смолы (эпон 812, эпон DDSA, эпон MNA, катализатор).

Подготовка проб для анализа.

Для приготовления ультратонких срезов фиксированные образцы (корни и листья) заливали в эпоксидную смолу эпон 812 по следующей методике:

– после фиксации пробы отмывали в 0,1М буфере Зоренсена с сахарозой (15мг/мл).

– затем проводили дегидратацию препаратов в серии спиртов, начиная с 10°, в 20°, в 30°, в 40°, в 50°, в 60° и в 70° по 30 минут в каждом при комнатной температуре.

– в 70° спирте образцы оставляли на 12 часов при комнатной температуре.

– на следующий день образцы переносили в 80° спирт, затем в 96° спирт на 30 минут в каждом.

– затем образцы проводили через две смены абсолютного ацетона по 60 минут в каждом.

Приготовление эпоксидной смолы:

– готовили смесь А – эпон 812 – 5мл + DDSA – 8мл смесь Б – эпон 812 – 8мл + MNA – 7мл,

– смеси А и Б смешивали в стеклянном стакане и перемешивали в течение 20–60 минут с помощью магнитной мешалки

– добавляли 1% (по весу) катализатора.

Далее образцы помещали в смеси ацетона с эпоном:

– в первую смесь, состоящую из 3–х частей ацетона и 1–ой части эпона на 24 часа;

– затем в смесь, состоящую из 2–х частей ацетона и 2–х частей эпона на 24 часа;

– далее в смесь, состоящую из 1–ой части ацетона и 3–х частей эпона на 24 часа.

– из последней смеси образцы стеклянной палочкой переносили в заливочные контейнеры с чистой смолой (100% эпон с катализатором). Для полимеризации смолы контейнеры с образцами инкубировали сначала при 37°C на 24 часа, потом при 45°C на 24 часа и наконец при 60°C на 24 часа.

Образцы, заключенные в смолу, выпиливали с помощью лобзика, помещали в держатели. На поверхности каждого образца вырезали пирамидку, и с поверхностей этих пирамидок на ультрамикротоме нарезали ультратонкие срезы. Неконтрастированные и неокрашенные срезы анализировали с помощью ПЭМ.

2.2.10.4 Проведение биохимических исследований

Оборудование:

– спектрофотометр СФ–2000,

– ВЭЖХ (система приборов фирмы Biotronic, Германия),

– детектор флуоресцентный RF-350 (Shimadzu, Япония), Em–350 nm, Ex–280 nm,

– колонка Lichrosorb RP–18, 6 мкм, 4x250

– центрифуга лабораторная Elmi CM–6,

– весы электронные лабораторные серии RV 214 OHAUS,

– рН метр рН–211,

- холодильник,
- фарфоровая ступка с пестиком,
- колбы мерные (25 – 500 мл),
- пипетки аналитические градуированные (1 – 10 мл),
- микропипетки, цилиндры мерные,
- пробирки центрифужные,
- кюветы кварцевые для спектрофотометра с длиной оптического пути 10 мм,
- стаканы химические (50 – 500 мл),
- бумага фильтровальная,
- шпатели,
- воронки.

Определение активности растворимых пероксидаз, каталазы и полифенолоксидазы, а также содержания хлорофиллов и каротиноидов осуществлялось фотометрическим методом, успешно зарекомендовавшим себя в многочисленных исследованиях на различных биообъектах (Бояркин, 1951; Ермаков и др., 1987; Паду, 1995; Сибгатуллина и др., 2011; Аеву, 1984) при помощи спектрофотометра СФ–2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия).

Определение активности растворимой пероксидазы

Реактивы

Ацетат натрия, уксусная кислота, гидроксид натрия, фенилметилсульфонилфторид, пероксид водорода, спирт изопропиловый, ацетон, хромовая смесь, вода дистиллированная.

Приготовление растворов и смесей реагентов

1) 0,2 М Na–ацетатный буфер (рН 5,0). Его готовили из следующих концентрированных растворов (сток–растворов):

0,2 М CH_3COOH (2,4 мл CH_3COOH доводили до 200 мл дистиллированной водой),

0,2 М CH_3COONa (5,44 г CH_3COONa доводили до 200 мл дистиллированной водой).

Для приготовления 100 мл раствора смешивали 30 мл 0,2 М раствора CH_3COOH и 70 мл 0,2 М раствора CH_3COONa . pH буфера корректировали с помощью CH_3COOH и 5% NaOH .

Перед использованием в ацетатный буфер добавляли фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) из расчета 20 мкл 100 мМ раствора ФМСФ на 2 мл буфера (34 мг ФМСФ растворяли в 2 мл изопропилового спирта).

2) 0,01% раствор солянокислого бензидина (на 10 проб: 5,6 мг бензидина растворяли в 1 мл концентрированной уксусной кислоты и доводили до 6 мл дистиллированной водой).

3) 0,3% перекись водорода (0,5 мл 3% перекиси водорода довести до 5 мл дистиллированной водой).

Ход определения

Навеску растительной ткани массой 200–300 мг растирали в фарфоровой ступке при температуре 4°C холодным пестиком с 0,5 мл ацетатного буфера (pH 5,0). Полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 12 000 g. Пробы (супернатант) хранили в холодильнике при 4°C.

Реакционная смесь содержит:

0,98 мл 0,2М Na–ацетатного буфера (pH 5,0)

0,5 мл 0,01% раствора солянокислого бензидина

0,02 мл супернатанта

0,5 мл 0,3% перекиси водорода

Контрольная кювета содержит:

1,48 мл 0,2 М Na–ацетатного буфера (pH 5,0)

0,5 мл 0,01% раствора солянокислого бензидина

0,02 мл супернатанта

Измерение оптической плотности проводили при длине волны 590 нм ежесекундно в течение 120 с.

После проведения опыта кюветы помещали в хромовую смесь на 30 минут, затем мыли дистиллированной водой и сушили ацетоном.

Расчет активности растворимой пероксидазы

Расчет активности пероксидазы в относительных единицах на один грамм сухого веса проводили по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычитали из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

V – общий объем полученной вытяжки, мл

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси делили на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому.

Для определения активности фермента на мг белка использовали следующую формулу:

$$A = ((\Delta D / T) \cdot X) / (L \cdot C),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычитали из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси делили на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

C – содержание белка в пробе, мг.

Определение активности каталазы

Реактивы

Дигидроортофосфат калия, фосфорная кислота, гидроксид натрия, фенилметилсульфонилфторид, пероксид водорода, ацетон, хромовая смесь, вода дистиллированная.

Приготовление растворов и смесей реагентов

1) 50 мМ К,Na–фосфатный буфер (рН 7,8).

2) 50 мМ К,Na–фосфатный буфер (рН 7,0).

Буферы готовили из следующих сток–растворов:

0,2 М KH_2PO_4 (1,36 г KH_2PO_4 растворяли и доводили до 50 мл).

0,2 М NaOH (400 мг NaOH растворяли и доводили до 50 мл).

Приготовление 50 мМ К,Na–фосфатного буфера, рН 7,8:

25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешивали и доводили до 100 мл дистиллированной водой. рН раствора корректировали с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5% NaOH.

Приготовление 50 мМ К,Na–фосфатного буфера, рН 7,0:

25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 14,55 мл 0,2 М NaOH смешивали и доводили до 100 мл дистиллированной водой.

3) экстракционный буфер (к 2 мл 50 мМ К,Na–фосфатного буфера (рН 7,8) добавляли 20 мкл раствора 100 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)).

4) 0,6 М перекись водорода (3 мл 3% перекиси водорода доводили до 4,5 мл дистиллированной водой).

Ход определения

Навеску растительной ткани массой 250 мг растирали в охлажденной ступке в 0,5 мл экстракционного буфера. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 12 000 г. Пробы (супернатант) хранили в холодильнике (4 °С).

Реакционная смесь содержит:

2,95 мл 50 мМ К,Na–фосфатного буфера (рН 7,0)

30 мкл супернатанта

Реакция запускается внесением в реакционную смесь 20 мкл 0,6 М перекиси водорода. Контрольная кювета содержит те же реактивы, но в нее не вносится перекись водорода.

Активность каталазы определяли по изменению оптической плотности при длине волны 240 нм каждую секунду в течение 120 с.

Расчет активности каталазы

Расчет активности каталазы в относительных единицах на один грамм сухого веса проводился по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычитали из оптической плотности в начале реакции оптическую плотность в конечный момент времени),

V – общий объем полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси делили на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому.

Для определения активности фермента на 1 мг белка использовали следующую формулу:

$$A = ((\Delta D / T) X) / (L \cdot C),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычитали из оптической плотности в начале реакции оптическую плотность в конечный момент времени),

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси делили на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, мм,

C – содержание белка в пробе, мг

Определение активности полифенолоксидазы

Реактивы

Дигидрофосфат калия, гидроортофосфат калия, пирокатехин, ацетон, хромовая смесь, вода дистиллированная.

Приготовление растворов и смесей реагентов

1. 1/15 М фосфатный буфер с pH 7,4.

Для приготовления 1/15 М фосфатного буфера 81,8 мл 1/15 М раствора гидроортофосфата натрия (11,866 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяли в мерной колбе объемом 1 л и доводили дистиллированной водой объем раствора в колбе до метки) помещали в мерную колбу на 100 мл и разбавляли 1/15 М раствором дигидроортофосфата калия (9,072 г KH_2PO_4 растворяли в мерной колбе объемом 1 л и доводили дистиллированной водой объем раствора в колбе до метки) до метки на колбе.

2. 0,05 М раствор пирокатехина.

Для приготовления 0,05 М раствора пирокатехина (M – 110 г/моль) 1,375 г вещества растворяли в воде и доводили в мерной колбе до 250 мл. Хранили в холодильнике.

3. Порошок полиамида (поликапролактама).

Капроновые гранулы тщательно обезжиривали дважды хлороформом или смесью хлороформа с дихлорэтаном (1:1 по объему). Сушили на воздухе в вытяжном шкафу, прополаскивали водой и сушили при 50–60 °С.

Затем 200 г капроновых гранул растворяли в 400 см³ HCl ($\rho=1,19$) в течение 15 мин. при комнатной температуре (18–20 °С). Для осаждения полиамида приливали 2,4 дм³ 50%-ного этанола. Суспензию при энергичном помешивании разбавляли водой (0,8 см³) и фильтровали на воронке Бюхнера. Осадок промывали три раза водой (по 3 дм³ каждый раз), а затем три раза раствором щелочи (30 г на 1 дм³). Далее отмывали осадок от щелочи до нейтральной реакции (по фенолфталеину), переносили на листы фильтровальной бумаги и сушили при комнатной температуре.

Ход определения

Навеску растительного материала массой 100 – 200 мг растирали в фарфоровой ступке в присутствии полиамида (50 – 100 мг) и буферного раствора, переносили в мерную колбу на 25 см³ и доводили буферным раствором до метки. Центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин.

В контрольную кювету вносили 0,5 см³ ферментной вытяжки, 2,0 см³ фосфатного буфера с рН 7,4 и 0,5 см³ H₂O.

В опытную кювету спектрофотометра вносили 0,5 см³ ферментной вытяжки, 2,0 см³ фосфатного буфера с рН 7,4 и 0,5 см³ раствора пирокатехина.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ 2000 при 420 нм с шагом 2 с в течение 120 с.

Расчет активности полифенолоксидазы

Расчет активности полифенолоксидазы в относительных единицах на один грамм сухого веса проводили по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычитали из оптической плотности в начале реакции оптическую плотность в конечный момент времени),

V – общий объем полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси делили на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому.

Для определения активности фермента на 1 мг белка использовали следующую формулу:

$$A = ((\Delta D/T)X)/(L \cdot C),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычитали из оптической плотности в начале реакции оптическую плотность в конечный момент времени),

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси делили на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, мм,

C – содержание белка в пробе, мг.

Измерение активности ферментов проводили в трёх биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляли в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

Определение концентрации хлорофилла a и b и каротиноидов

Реактивы

100%-ный ацетон, хромовая смесь, вода дистиллированная, промытый и прокаленный песок.

Ход определения

Навеску растительного материала массой 0,1 г растирали в фарфоровой ступке с добавлением песка, последовательно смачивая небольшими

порциями 100%-ного ацетона. Каждую порцию растворителя сливали в мерную колбу объемом 25 мл. Последней была порция обесцвеченного ацетона. Объединенные порции экстракта доводили в колбе растворителем до метки. Во избежание возможных потерь пигментов стенки применяемой для гомогенизации и экстракции посуды тщательно промывали 100%-ным ацетоном.

Центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ 2000 при длинах волн: хлорофилл а – 662 нм, хлорофилл b – 644 нм, каротиноиды – 440,5 нм.

Контрольная проба – 100%-ный ацетон.

Расчет концентрации хлорофилла а и b и каротиноидов

Расчет содержания пигментов в навеске растительного материала проводили по формулам:

$$C_a = 11,7 \cdot D_{662} - 2,09 \cdot D_{644},$$

$$C_b = 21,19 \cdot D_{644} - 4,56 \cdot D_{662},$$

$$C_{a+b} = 7,14 \cdot D_{644} + 19,1 \cdot D_{662},$$

$$C_k = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot C_{a+b},$$

C_a – концентрация хлорофилла а, мг/л;

C_b – концентрация хлорофилла b, мг/л;

C_{a+b} – суммарная концентрация хлорофиллов а и b, мг/л;

C_k – общая концентрация каротиноидов, мг/л;

D_{662} – оптическая плотность раствора при длине волны 662 нм;

D_{644} – оптическая плотность раствора при длине волны 644 нм;

$D_{440,5}$ – оптическая плотность раствора при длине волны 440,5 нм.

Измерение концентрации хлорофиллов и каротиноидов проводили в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляли в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

Содержание эндогенных фитогормонов (абсцизовая кислота –АБК, гибберелловая кислота –ГК, цитокинины –ЦК, индолилуксусная кислота – ИУК) определяли в одной навеске растительного материала. Данная методика определения фитогормонов была разработана в лаборатории регуляторов роста МСХА имени К.А.Тмиряева (Скоробогатова и др., 1999).

Фиксация и пробоподготовка образцов для определения фитогормонов

Содержание эндогенных образцов определяли в одной навеске. Навеску растительного материала заливали охлажденным 80% метанолом и оставляли при 4 °С в холодильнике на 2 недели.

Растительную массу отфильтровывали и метанольный раствор упаривали до водного остатка, который затем подкисляли 1%-ным раствором HCl до pH 2–3. Подкисленный водный остаток очищали 3-кратной экстракцией гексаном в соотношении 1:1. Гексановые экстракты отбрасывали и к водному остатку добавляли 1%-ный раствор антиоксиданта (неозон «Д» – 1 мл на пробу). Все пробы доводили до одного объема дистиллированной водой. Затем эти растворы трижды экстрагировали на качалке этилацетатом в соотношении 1:1 (30 мин при 200 об/мин). Этилацетатные вытяжки объединяли, упаривали досуха и оставляли для определения гибберелловой, абсцизовой и индолилуксусной кислот. Оставшийся после экстракции водный остаток доводили 20%-ным раствором КОН до pH 8 и два раза экстрагировали насыщенным бутанолом (30 мин при 200 об/мин). Бутанольную фракцию упаривали досуха и оставляли для определения цитокининов.

Сухой этил ацетатный остаток растворяли в 2 мл фосфатного буфера pH 8 и пропускали через колонку с поливинилпирролидоном – 0.51г. Элюировали фосфатным буфером и собирали во фракции 1–5 ГК и АБК, во фракции 6–10 – ИУК (объемом 2 мл каждая).

Определение содержания индолилуксусной кислоты

Для определения ИУК фракции подкисляли 1%-ным раствором HCl до pH 2–3 и два раза экстрагировали диэтиловым эфиром (30 мин при 200

об/мин). Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ. Подвижная фаза – 40% –ный водный раствор метанола, скорость потока 0,5 мл/мин, время удерживания – 12 мин. Идентификация ИУК проводилась сравнением времен удерживания синтетической ИУК (Sigma) с природной. Минимальная регистрируемая концентрация ИУК составила 2,0 нг в аликвоте пробы (20 мкл).

Определение содержания гиббереллинов (GA₃)

Для определения гиббереллинов отбирали из фракций 1–5 по 5 мл и подкисляли 1%–ным раствором HCl pH 2–3. Гиббереллины экстрагировали трижды этилацетатом в соотношении 1:1 (30 мин при 200 об/мин). Этилацетатный раствор упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в дистиллированной воде с добавлением водного аммиака и в этом растворе определяли биологическую активность гиббереллинов по методу Франкленда и Уоринга (1960) с использованием салата сорта Берлинский, который обладает высокой чувствительностью к данному фитогормону.

Определение содержания цитокининов

Сухой бутанольный остаток растворяли в 2 мл 80%–ного метанола. Метанольный экстракт пропускали через колонку, заполненную 0.51 г поливинилпирролидона (Polyclar AT, Serva). Цитокинины элюировали 80%–ным раствором метанола с добавлением концентрированного аммиака и упаривали досуха. Полученные пробы анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Условия хроматографирования при работе приборов фирмы Biotronic: детектор ультрафиолетовый (модель BT 3030), длина волны 268 nm, колонка Lichrosorb RP–18, 6 мкм, 4x150. Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–уксусная кислота (V/V – 55:44:1), скорость потока 0,8 мл/мин, время удерживания – 10 мин. Идентификация зеатина проводилась сравнением времен удерживания синтетического зеатина (Calbiochem) с природным. Минимальная регистрируемая концентрация зеатина составила 20,0 нг в аликвоте пробы (20 мкл).

Определение содержания абсцизовой кислоты

Для определения АБК фракции подкисляли 1%-ным раствором HCl до pH 2–3 и два раза экстрагировали диэтиловым эфиром (30 мин при 200 об/мин). Полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ. Подвижная фаза – 40%-ный водный раствор метанола, скорость потока 0,6 мл/мин, время удерживания АБК – 12 мин. Идентификация АБК проводилась сравнением времен удерживания синтетической АБК (Calbiochem) с природной. Минимальная регистрируемая концентрация АБК составила 10 нг в аликвоте пробы (20 мкл).

Измерение содержания фитогормонов проводили в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляли в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»). Различия признавались достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

2.2.11 Оценка воздействия многостенных углеродных нанотрубок на организм млекопитающих

2.2.11.1 Характеристика используемых животных и условия их содержания

В исследованиях использовались половозрелые лабораторные мыши – гибриды C57B/6×DBA2 возрастом 2 месяца и массой 19 ± 1 г. В эксперименте были задействованы 91 самец и 420 самок.

Все манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации и отвечали международным принципам надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434-2009) с учетом рекомендаций по содержанию и использованию лабораторных животных (Руководство по содержанию...2001). На протяжении эксперимента животные содержались в клетках для содержания грызунов вместимостью до 13 особей при 12-часовом светопериоде, температуре $+22^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха – 40-60%. В качестве

подстилки использовались автоклавированные опилки лиственных видов деревьев. В качестве корма использовался стандартный гранулированный корм «Комбикорм ПК-120» специально разработанный для содержания лабораторных крыс, мышей и хомяков (ГОСТ Р 50258-92).

2.2.11.2 Исследование острой токсичности

Для исследования острой токсичности были сформированы 3 группы животных (контроль, «Сажа», и МУНТ) по 7 самцов в каждой. Перед экспозицией животные содержались в условиях карантина в течение 10 дней. Исследуемые материалы вводились однократно внутривентрикулярно в дозе 5000 мг/кг. Контрольной группе вводилась дистиллированная вода. Общая схема эксперимента представлена на рисунке 22.

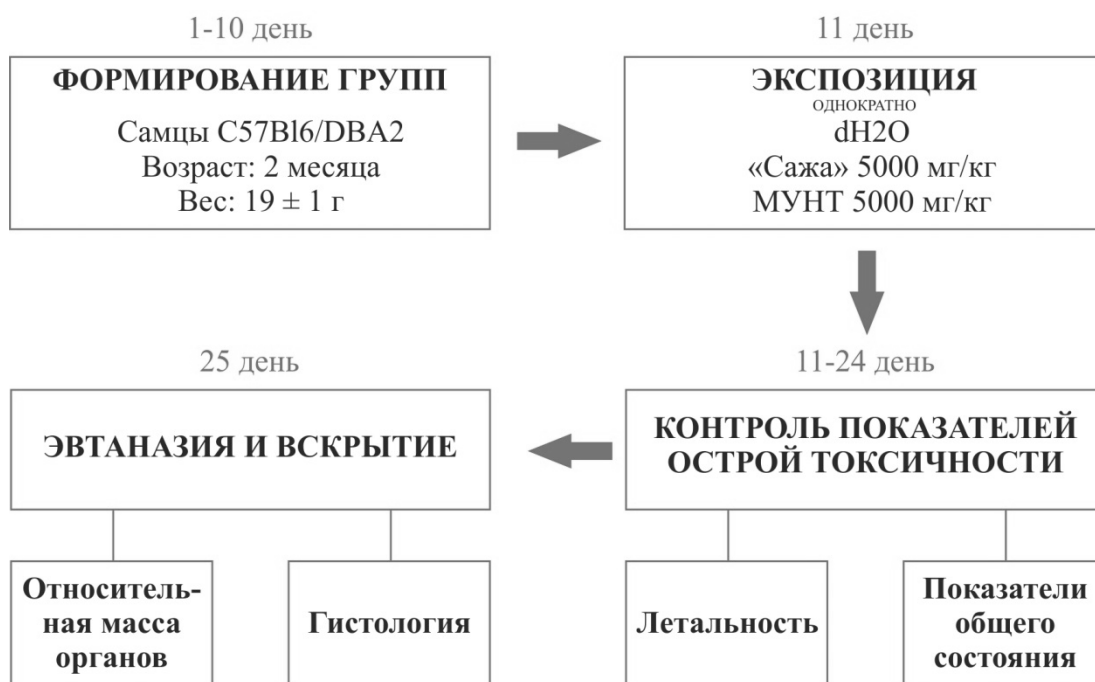


Рисунок 22 – Схема оценки токсичности МУНТ на лабораторных мышах в остром эксперименте

Наблюдение за состоянием животных производилось в течение двух недель после введения материала с контролем летального действия и таких показателей общего состояния животных, как интенсивность и характер

двигательной активности, состояние кожного и волосяного покрова, потребление воды и корма (Фисенко, 2000).

Летальное действие вводимого НМ фиксировалось по количеству летальных исходов внутри экспериментальных групп животных на протяжении всего контролируемого периода.

По окончании контрольного периода все животные были подвергнуты эвтаназии путем дислокации шейных позвонков (Манк, 1990). Затем осуществлялся расчет относительной массы висцеральных органов и проводились гистологические исследования.

Расчет относительной массы висцеральных органов

Расчет относительной массы органа I_m производился по следующей формуле:

$$I_m = \frac{m}{M} \times 100\%,$$

где m – абсолютное значение массы органа, гр., M – общая масса тела животного.

Гистологические исследования внутренних органов самцов лабораторной мыши

Печень, почки и легкое фиксировали в 10% забуференном формалине, после чего обрабатывали в гистологическом процессоре конвейерной проводки Tissue-Tek Xpress фирмы «SAKURA» (Япония), и заливали гомогенизированной парафиновой средой для гистологической заливки тканей «Мелтекс» фирмы «JLS Chemical» (Россия).

Семенники фиксировали в жидкости Буэна, проводили обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации и ксилолах и заливали гомогенизированной парафиновой средой «Мелтекс» фирмы «JLS Chemical» (Россия).

С каждого полученного блока делали по 5 срезов толщиной 4-5 мкм с использованием ротационного микротомы Ротмик-1 (Россия). Окрашивали

препараты гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам (Саркисова, Петрова, 1996).

2.2.11.3 Исследование подострой токсичности

Для оценки токсичности МУНТ в подостром эксперименте были сформированы 5 групп (Контроль, «Сажа» 30 мг/кг, МУНТ 0,3 мг/кг, МУНТ 3 мг/кг и МУНТ 30 мг/кг) по 14 животных в каждой. Перед экспозицией животные содержались в условиях карантина в течение 10 дней. Материал вводился перорально путем замены питьевой воды на свежеприготовленный с коллоидный раствор (см. разд. 2.2.3). Общая схема эксперимента представлена на рисунке 23.

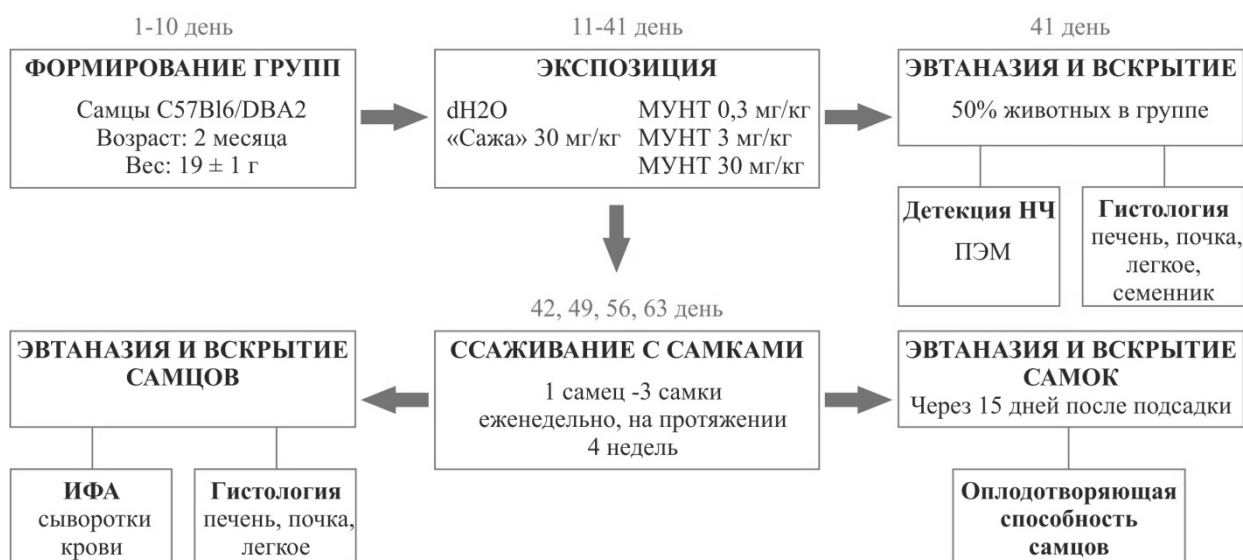


Рисунок 23 - Схема оценки токсичности МУНТ на лабораторных мышцах в подостром эксперименте.

На протяжении всего срока экспозиции ежедневно фиксировались показатели общего состояния животных, включающие оценку двигательной активности, реакции на звуковой и болевой раздражитель, изменение окраса шерсти и волосяного покрова, а также пищевое и питьевое поведение. Данные виды исследований проводились с учетом методических рекомендаций по токсиколого-гигиенической оценке безопасности НМ

(Методические указания... 2009). Помимо обозначенных выше показателей, еженедельно фиксировалась динамика набора массы тела экспериментальных животных с использованием электронных весов AND EK-2000i (Япония). Точность взвешивания – 0,1 г.

По окончании срока экспозиции из каждой группы было отобрано по 7 животных для детекции НЧ в тканях экспонируемых животных, а также выявления токсических эффектов гистологическим и цитогистологическим методами.

Детекция НЧ методом просвечивающей электронной микроскопии

Подготовка биоматериала для электронно-микроскопического исследования выполнялась по следующей методике:

1. Кусочки органа экспериментального животного (печени, почки) фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом с 2% формалином на 0,1М PBS pH 7,2;

2. Отмывали от фиксатора в 0,1М PBS 2 раза по 15 минут;

3. Выдерживали в 1% OsO₄ 2 часа в темноте;

4. После этого кусочки помещали в емкости с этиловым спиртом восходящей концентрации и ацетоном по следующей схеме:

– 50%-й C₂H₅OH (в темноте, +4°C) до прекращения потемнения раствора;

– 60%-й C₂H₅OH (2 раза по 20 мин +4°C);

– 70%-й C₂H₅OH (на 12 часов в холодильник);

– 80%-й C₂H₅OH на 20 мин (+4°C);

– 96%-й C₂H₅OH на 20 мин;

– 100%-й C₂H₅OH (3 раза по 30 мин);

– C₃H₆O 60 мин,

– смесь C₃H₆O –эпон 3:1 на 2 часа;

– смесь ацетон–эпон 1:1 на 2 часа;

– смесь ацетон–эпон 1:3 на 12 часов;

– эпон на 1–2 часа.

5. После полимеризации эпоксидной смолы выпиливали блок для дальнейшей работы на ультрамикротоме.

6. Ультратонкие срезы 100-120 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultratom Type 4802A и помещали на медные сеточки и бленды с формваровой подложкой.

Исследование образцов биологического материала проводили на микроскопе JEM 2100 (JEOL, Япония) Обработку полученных спектров проводили в программе Digital Micrograph 2.01.

Гистологические исследования проводились по методике, описанной в разделе оценки острой токсичности.

Цитогистологический анализ семенников самцов лабораторной мыши

Для оценки выраженности гонадотропного действия был проведен цитогистологический анализ семенников. Для этого вычисляли индекс сперматогенеза (ИС) по 4-х бальной системе в соответствии с методикой: на гистологических препаратах семенников подсчитывали 100 строго поперечных срезов извитых семенных канальцев, отмечая среди них число канальцев, содержащих следующие стадии развития половых клеток:

- 1 – сперматогонии;
- 2 – сперматогонии и сперматоциты;
- 3 – сперматогонии, сперматоциты и сперматиды;
- 4 – сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды.

Индекс сперматогенеза рассчитывался по формуле

$$ИС = \sum A_n / 100,$$

где A_n - сумма чисел стадий в каждом канальце, 100 – число подсчитанных канальцев (Юнда, 1990; Саноцкий, 1970).

К каждому оставшемуся самцу экспериментальных и контрольной групп животных для оценки оплодотворяющей способности еженедельно на протяжении четырех недель подсаживалось по три виргинных неэкспонированных самок. Фиксировалось наличие или отсутствие полового

поведения. Через 15 дней после подсадки, самки были вскрыты для оценки качества потомства.

Расчет индекса оплодотворяющей способности самцов (Хабриева, 2005) проводился по формуле:

$$I = \text{число забеременевших самок} / \text{общее число подсаженных самок} \times 100\%$$

Эвтаназия самок и получение эмбрионального материала

Эвтаназию самок осуществляли путем дислокации шейных позвонков. После этого вскрывали брюшную полость, вырезали матку и, во избежание высыхания плодов, переносили их в емкость с физиологическим раствором. Не вынимая из жидкости производили вскрытие рогов матки, подсчитывали количество живых и мертвых плодов. Извлекали плоды, освобождая их из оболочек, и оценивали массу эмбрионов (Смольникова и др., 1998).

Наружный осмотр плодов

Все живые плоды каждого помета обследовали под стереоскопическим бинокулярным микроскопом Биомед МС-1 для обнаружения внешних видимых аномалий развития, отмечали состояние каждого плода и описывали видимые аномалии.

По завершении подсажек самцы последние были вскрыты для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) на содержание в плазме крови кортикостерона и тестостерона.

Для количественного *in vitro* определения кортикостерона использовался специализированный набор для определения кортикостерона мышей или крыс в образцах сыворотки или плазмы иммуноферментным методом «Corticosterone EIA» фирмы IDS (Великобритания).

Для количественного *in vitro* измерения свободного тестостерона в плазме крови экспериментальных и контрольных животных использовался иммуноферментный набор для определения свободного тестостерона «Mouse free testosterone (F-TESTO) ELISA» фирмы Cusabio (Китай).

Все манипуляции выполнялись согласно методикам, прилагаемым производителями соответствующих наборов реактивов. Для проведения данного анализа использовался микропланшетный фотометр Multiskan EX (Thermolab systems, Финляндия).

Математическая обработка первичных данных ИФА выполнялась с использованием компьютерной программы Sigma Plot.

3 АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ В СРЕДАХ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПЕРЕХОДА МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В БИОДОСТУПНУЮ ФОРМУ

Исследование микроструктуры исходных образцов МУНТ проводился с помощью электронной микроскопии. Применение методов просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии позволило идентифицировать исследуемый материал как МУНТ и описать его важнейшие структурные характеристики. Результаты СЭМ-анализа, подтвердившие наличие МУНТ, представлены в разделе 2. На рисунке 24 представлены результаты ПЭМ, согласующиеся с полученными с использованием СЭМ данными.

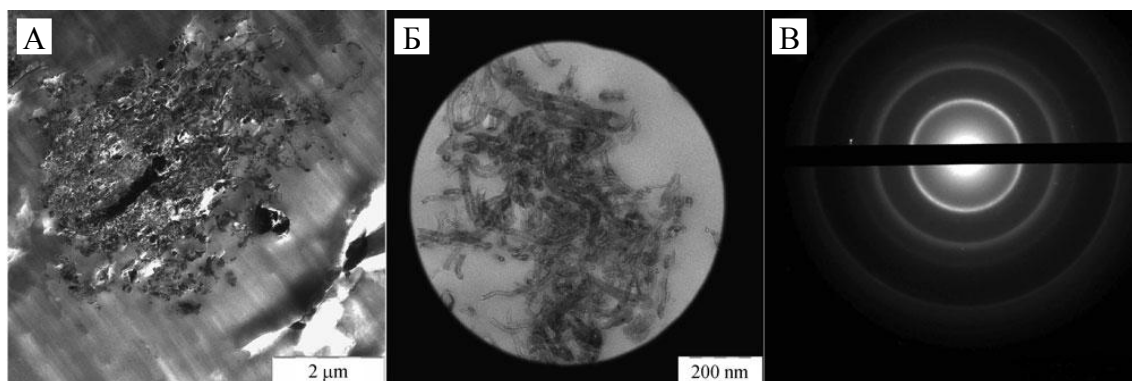


Рисунок 24 – ПЭМ анализ МУНТ с использованием дифракции электронов. А) Ультратонкий срез образца МУНТ. Б) Область среза, проанализированная с помощью дифракции электронов. В) Дифракционная картина этого участка.

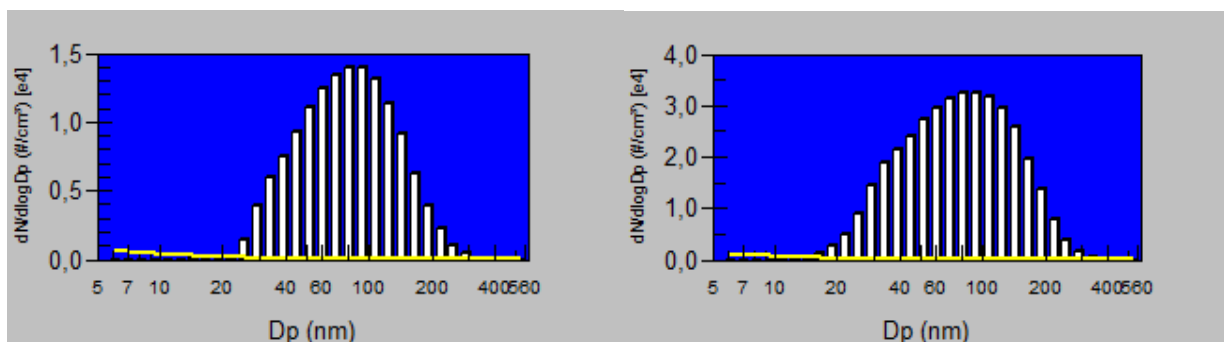
Из 8-ми образцов различных партий МУНТ для дальнейших исследований было отобрано 2 образца: «МУНТ 1» имеющие среднее значение внешнего диаметра 28 нм и «МУНТ 2» – 15 нм.

Исследование содержания МУНТ в атмосфере зоны их производства (Рис. 25) позволило установить способность перехода НЧ в аэрозольное состояние.



Рисунок 25 – Проведение анализа содержания НЧ в воздухе в производственном помещении объекта nanoиндустрии с помощью спектрометра-классификатора частиц с высокой мобильностью FMPS модель 3091

Показатель концентрации НЧ в воздухе производственной зоны ($2,4 \cdot 10^4$ шт./см³), превысил контрольное значение ($8,80 \cdot 10^3$ шт./см³) в 2,74 раза (Рис. 26). В производственной зоне отмечена фракция более мелких частиц (максимум распределения 78 нм, диапазон размеров частиц от 11 нм до 340 нм) по сравнению с контролем (максимум распределения 80 нм, диапазон размеров от 14,3 нм до 339,8 нм). Это подтверждает наличие возможности загрязнения окружающей среды исследуемыми МУНТ, что согласуется с результатами работы Халиуллина (Халиуллин, 2013).



А

Б

Рисунок 26 – Распределение аэрозольных МУНТ по размерам и концентрации контроль (А) – производственная зона и эксперимент (Б) – производственная зона

Важной научно-методической задачей, стоявшей на данном этапе работы, было обеспечение последующих экотоксикологических исследований гомогенными водными суспензиями исследуемых НЧ, с учетом их гидрофобности и склонности к агломерации. Отмечается, что образование агрегатов НМ в коллоидных системах может существенным образом влиять на их токсичность (Dayeh et al., 2004; Godymchuk et al., 2015). Несмотря на то, что в природных условиях возможно воздействие на биообъекты как отдельных НЧ, так и их агломератов, в нашей работе приоритет был отдан исследованию экотоксичности наиболее мелкой фракции, согласно сложившимся к настоящему времени представлениям являющейся наиболее опасной. Способность УНТ к самопроизвольному увеличению степени дисперсности при взаимодействии с природными органическими веществами подчеркивается в работе (DeRosa et al., 2010), поэтому моделирование процессов диспергирования НЧ в водной среде представляется оправданным. В ходе разработки методов гомогенизации исследуемого материала с целью достижения максимальной степени разбиения агломератов НЧ и получения стабильных суспензий, были подготовлены дисперсии УНТ и сажи в дистиллированной воде с использованием двух принципов диспергирования:

- высокоинтенсивных кавитационных воздействий;
- механических воздействий.

Для исследования влияния высокоинтенсивных кавитационных воздействий на разрушение агломератов и стабильность получаемых суспензий использовался метод генерации кавитации вследствие распространения ультразвуковой акустической волны. Ультразвуком называются распространяющиеся в квазиупругой среде (жидкость, твердое тело, газы) волны, которые представляют собой периодически чередующиеся сжатия и разрежения частиц этой среды с частотой выше 16 кГц. Кавитацией называется процесс образования и исчезновения пузырьков или каверн в жидкости вследствие локального изменения давления. Это явление наблюдается только в жидкости и не развивается в газах или твердых телах. С точки зрения акустических колебаний, кавитация – это разрыв сплошности жидкости в результате внешнего воздействия, в частности, переход от акустических колебаний с малой амплитудой к колебаниям с большей амплитудой, при которых сплошность жидкости нарушается, и в ней возникают кавитационные пузырьки, обусловленные качественным изменением колебательного процесса в жидкости.

Диспергирование с использованием высокоинтенсивных кавитационных воздействий можно отнести к активному измельчению, так как агломераты разрушаются независимо от их размера и плотности. Они разрываются под действием колебаний среды и микроударного действия ультразвуковой кавитации. При получении суспензий озвучиванием также имеют место: знакопеременное давление, которое возникает в каждый полупериод прохождения волны в зонах сжатия и разрежения (в случае стоячей волны в точках максимума давление удваивается); звуковой ветер, направленный в сторону от излучателя, вызывающий мощные течения во всем озвучиваемом объеме; значительные амплитудные смещения и ускорения, которые воздействуют на частицы среды, вызывая их мгновенные перемещения в пространстве; растворение воздушных пузырьков

Апробация различных методов пробоподготовки выявила наибольшую эффективность при создании стабильных коллоидных систем комплексного

подхода, включающего методы оценки размера, ζ -потенциала НЧ и ультразвукового диспергирования.

С целью установления экспериментальных принципов и создания технологии получения стабильных суспензий углеродных НМ (различных образцов МУНТ и сажи) в дистиллированной воде с максимальной степенью разбиения агломератов было исследовано влияние концентрации, времени обработки, состава, а также условий обработки суспензий кавитационными воздействиями. Выбранные для исследования составы и условия обработки представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Составы суспензий углеродных НЧ, подготовленных с использованием кавитационных воздействий

| Дисперсная фаза | Дисперсионная среда | Концентрация, % масс. | Время обработки, мин. |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| «МУНТ 1» | Дистиллированная вода | 0,1 | 5 |
| | | | 10 |
| | | 0,01 | 5 |
| | | | 10 |
| «МУНТ 2» | | 0,1 | 5 |
| | | | 10 |
| | | 0,01 | 5 |
| | | | 10 |
| «Сажа 1» (тоже) | 0,1 | 5 | |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |
| «Сажа 2» | 0,1 | 5 | |
| | | 10 | |

| | | | |
|--|--|------|----|
| | | 0,01 | 5 |
| | | | 10 |

Изучение влияния механических воздействий на разбиение агломератов и стабильность получаемых суспензий проводилось с использованием коллоидной мельницы, предназначенной для диспергирования, перемешивания и измельчения порошков в жидких средах. Составы суспензий, подготовленных посредством механических воздействий были аналогичны составу суспензий, полученных с помощью кавитационных воздействий (Табл. 5).

Эффективность метода диспергирования на данном этапе определялась по скорости агрегации и седиментации суспензий, результаты исследования свойств (степень разбиения агломератов и седиментационная устойчивость) полученных суспензий углеродных НЧ приведены далее. В таблицах 6 и 7 представлены результаты экспериментов по разработке методов диспергирования углеродных НЧ с целью достижения максимальной степени разбиения агломератов и получения стабильных суспензий.

Таблица 6 – Результаты диспергирования углеродных НЧ с использованием кавитационных воздействий

| Дисперсная фаза | Концентрация , % масс. | Время обработки, мин. | Результат |
|-----------------|------------------------|-----------------------|--|
| «МУНТ 1» | 0,1 | 5 | Визуально определяемые крупные агломераты частиц, спустя 5 мин после диспергирования |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |
| «МУНТ 2» | 0,1 | 5 | – – |
| | | 10 | |

| | | | |
|----------|------|----|---|
| | 0,01 | 5 | Гомогенно, отсутствие осадка, и агломератов |
| | | 10 | |
| «Сажа 1» | 0,1 | 5 | Выпадение осадка агломератов НЧ, спустя 5 мин после диспергирования |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |
| «Сажа 2» | 0,1 | 5 | Выпадение осадка углеродных НЧ, присутствие агломератов |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | Присутствие незначительного количества агломератов |
| | | 10 | |

По результатам диспергирования углеродных НЧ с использованием высокоинтенсивных кавитационных воздействий, установлено, что изменение времени обработки в диапазоне от 5 до 10 мин. не сказывается на равномерности распределения частиц в дисперсионной среде. Отмечена высокая однородность и стабильность суспензии «МУНТ 2» при концентрации 0,01 %.

Значительные различия между эффективностью диспергирования «МУНТ 1» и «МУНТ 2», могут быть связаны с более плотной структурой пучков «МУНТ 1».

Таблица 7 – Результаты диспергирования углеродных НЧ с использованием механических воздействий

| Дисперсная фаза | Концентрация, % масс. | Время обработки, мин. | Результат |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|---|
| «МУНТ 1» | 0,1 | 5 | Визуально определяемые крупные агрегаты частиц, сразу после проведения процесса диспергирования |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |

| | | | |
|-------------|------|----|--|
| «МУНТ 2» | 0,1 | 5 | |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |
| «Сажа 1» | 0,1 | 5 | |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |
| «Сажа 2» | 0,1 | 5 | |
| | | 10 | |
| | 0,01 | 5 | |
| | | 10 | |

По результатам диспергирования углеродных НЧ с использованием механических воздействий, установлено, что требуемый эффект создания однородных стабильных суспензий при выбранных условиях эксперимента не достигается.

Анализ результатов, полученных при разработке методов диспергирования углеродных НЧ с целью получения максимальной степени разбиения агломератов, указывает на то, что использование механических воздействий не приводит к достаточно равномерному распределению частиц в дисперсионной среде, что может негативно сказаться на воспроизводимости результатов исследований полученных подобным образом суспензий.

Наибольшую эффективность диспергирования углеродных НЧ в дисперсионной среде показало использование высокоинтенсивных кавитационных воздействий. Высокая стабильность и однородность распределения частиц отмечена для суспензий «МУНТ 2» и «Сажа 2», полученных с использованием кавитационных воздействий, что, вероятно, связано со структурными и физико-химическими характеристиками данных образцов. Также, следует отметить, что увеличение времени обработки

свыше одной минуты не оказывает заметного влияния на эффективность процесса разбиения агломератов.

Исследование степени диспергирования агломератов углеродных НЧ проводилось с использованием метода динамического рассеяния света (ДРС), который основан на анализе броуновского движения частиц и последующего расчета распределения по размерам ансамбля совокупности частиц в растворе. Для частиц в растворе, облучаемых монохромным источником света (лазером), интенсивность рассеяния, измеряемая детектором, размещенным в некоторой точке пространства, будет зависеть от относительной позиции этих частиц в рассеивающем объеме. Если частицы статичны, то ожидается, что будет наблюдаться постоянная во времени интенсивность рассеяния, однако, на практике частицы диффундируют из-за броуновского движения, и интенсивность рассеянного света флуктуирует около значения эквивалентного статической интенсивности. Эти флуктуации известны как динамическая интенсивность. Вычисления параметров НЧ в коллоидных растворах соответствуют требованиям Международного Стандарта ISO 13321:1996 E (Анализ Размеров Частиц – Фотонная Корреляционная Спектрометрия). Исследование степени разбиения агломератов УНМ методом ДРС проводилось с использованием системы для характеристики НЧ Malvern Zetasizer Nano. Система реализует принцип двухуглового анализатора размеров частиц для более точного обнаружения агрегатов и измерения небольших по объему или разбавленных образцов, а также образцов с очень высокой концентрацией.

Из результатов исследования степени диспергирования (гомогенизации) агломератов углеродных НЧ в подготовленных образцах суспензий, представленных в таблице 8, следует, что наибольшую величину гидродинамического диаметра имеют образцы суспензий, содержащие 0,1% частиц «Сажа 1» и «Сажа 2» что, вероятно, связано с большей склонностью к агломерации частиц сажи, а также высокой концентрацией частиц в суспензиях.

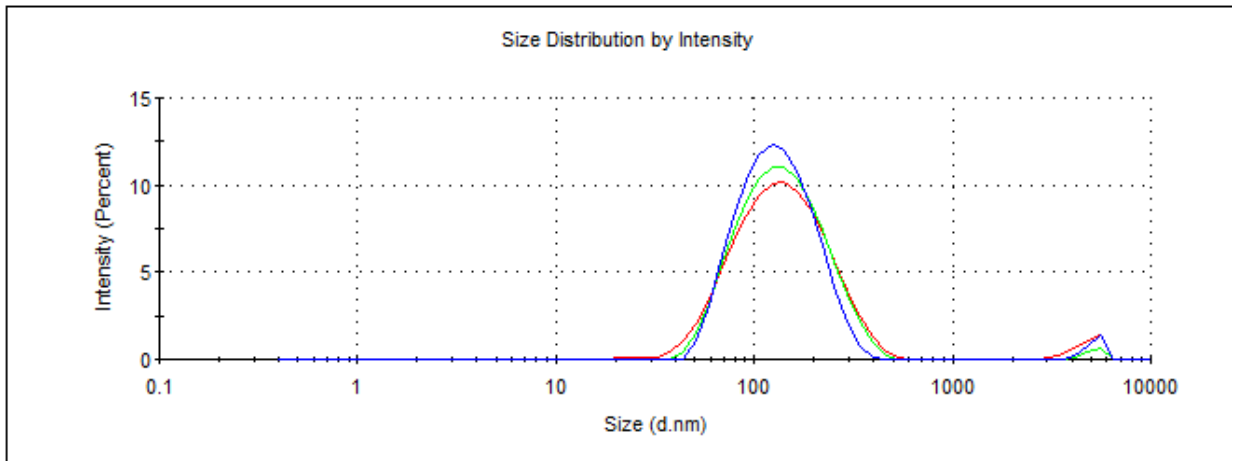
Таблица 8 – Характеристики степени диспергирования агломератов УНМ в подготовленных образцах суспензий

| Образец | Номер | Средний диаметр, нм | Pdl | Корреляция | Пик (нм) | Инт. пика % |
|------------------------------|-------|---------------------|-------|------------|----------|-------------|
| «МУНТ 1»; 0,01% масс | 1 | 128,5 | 0,289 | 0,908 | 152,7 | 96,3 |
| | 2 | | | | 4824 | 3,5 |
| | 3 | | | | 24,65 | 0,2 |
| «МУНТ 1»; 0,1% масс | 1 | 128,6 | 0,525 | 0,885 | 120,5 | 100 |
| | 2 | | | | 0 | 0 |
| | 3 | | | | 0 | 0 |
| «МУНТ 2»; 0,01% масс | 1 | 469,7 | 0,395 | 0,810 | 112,1 | 100 |
| | 2 | | | | 0 | 0 |
| | 3 | | | | 0 | 0 |
| «Сажа 1»;- 0,01% масс. | 1 | 703,5 | 0,058 | 0,923 | 757,6 | 100 |
| | 2 | | | | 0 | 0 |
| | 3 | | | | 0 | 0 |
| «Сажа 1»; 0,1% масс. | 1 | 1627 | 0,417 | 0,878 | 1147 | 100 |
| | 2 | | | | 0 | 0 |
| | 3 | | | | 0 | 0 |
| «Сажа 2»; - 0,01% масс | 1 | 1008 | 0,595 | 0,866 | 1351 | 70,4 |
| | 2 | | | | 100,3 | 29,6 |
| | 3 | | | | 0 | 0 |
| «Сажа 1» | 1 | 17630 | 1 | 0,842 | 1 441 | 100 |

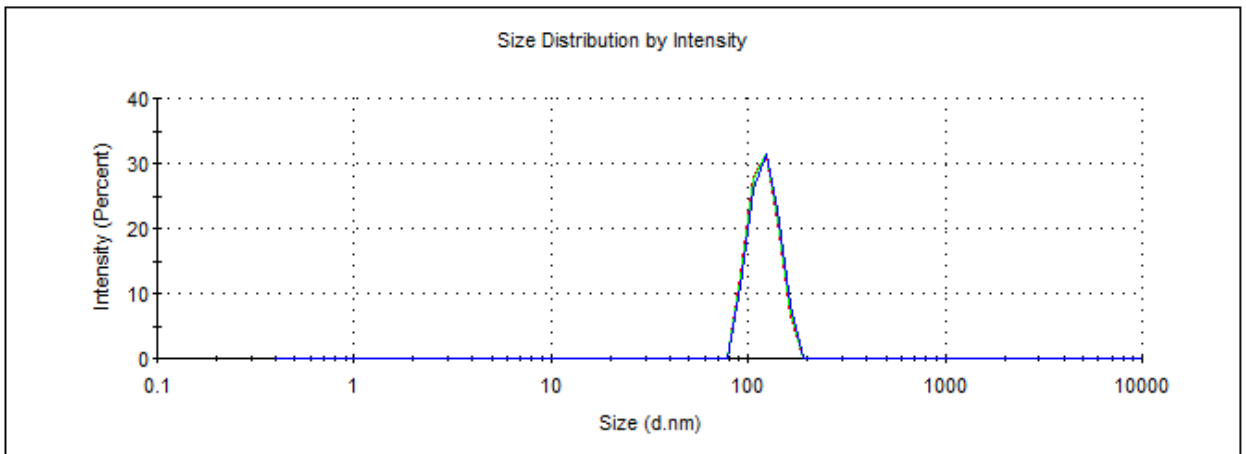
| | | | | | | |
|--------------|---|--|--|--|---|---|
| 2»; - | 2 | | | | 0 | 0 |
| 0,1% масс | 3 | | | | 0 | 0 |

В связи с тем, что анализ средних значений дает качественное описание системы (размера частиц, агломератов), сравнимое с результатами других методов анализа только для сферических частиц с узким и мономодальным распределением (индекс полидисперсности менее 0,1), то для образцов с более широким распределением средний размер и индекс полидисперсности могут использоваться лишь как сравнительные параметры. Для еще более широких распределений, с индексом полидисперсности больше 0,5, не рекомендуется ориентироваться на значения среднего размера, и анализ следует проводить на основании оценки параметров и положений пиков распределения. Поскольку из данных таблицы 8 следует, что индекс полидисперсности для всех образцов суспензий углеродных наночастиц с концентрацией 0,1% масс. больше 0,5, то для исследуемых образцов данная рекомендация является справедливой.

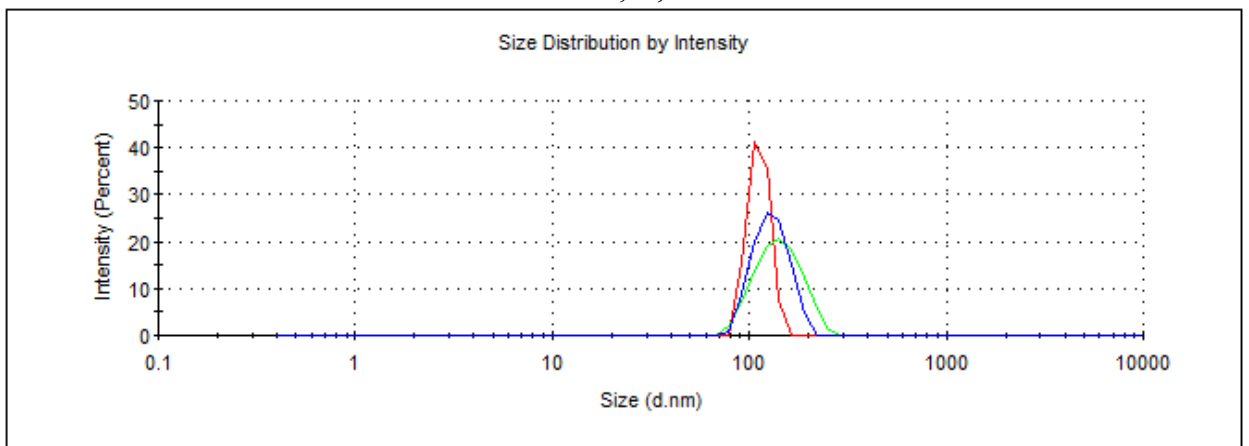
В графической форме результаты исследований зависимости интенсивности рассеяния от размера частиц представлены на рисунках 27 – 28; видно, что образцы «МУНТ 2» и «Сажа 2» образуют наиболее высокодисперсные коллоидные системы.



«МУНТ 1»; 0.01% масс.

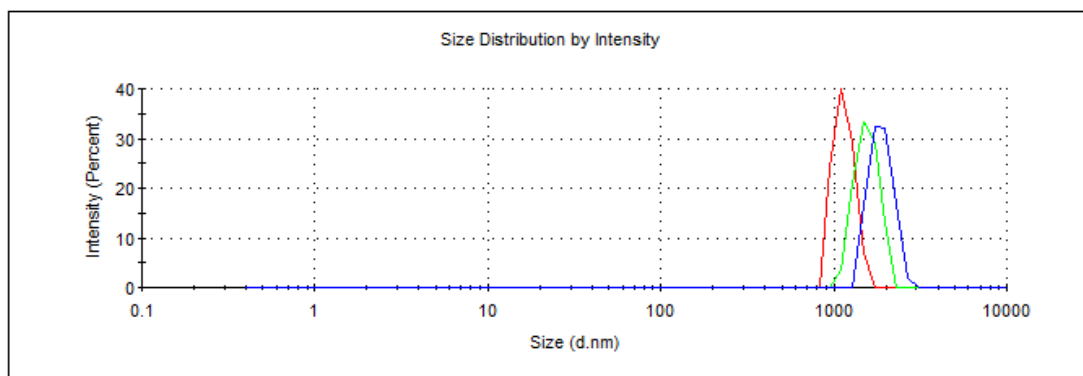


«МУНТ 1»; 0,1% масс.

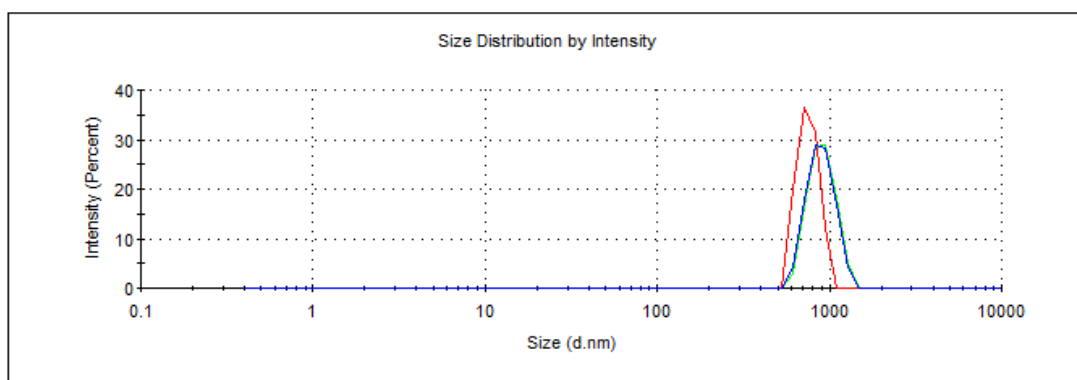


«МУНТ 2»; 0,01% масс.

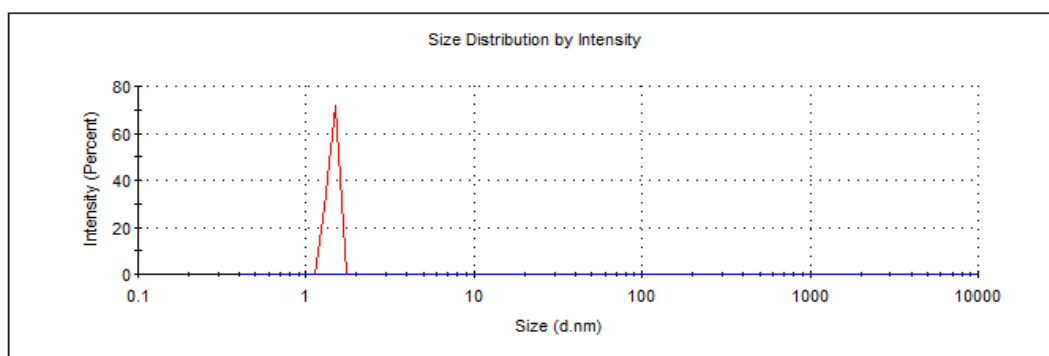
Рисунок 27 – Зависимости интенсивности рассеяния от размера агломератов и частиц УНТ



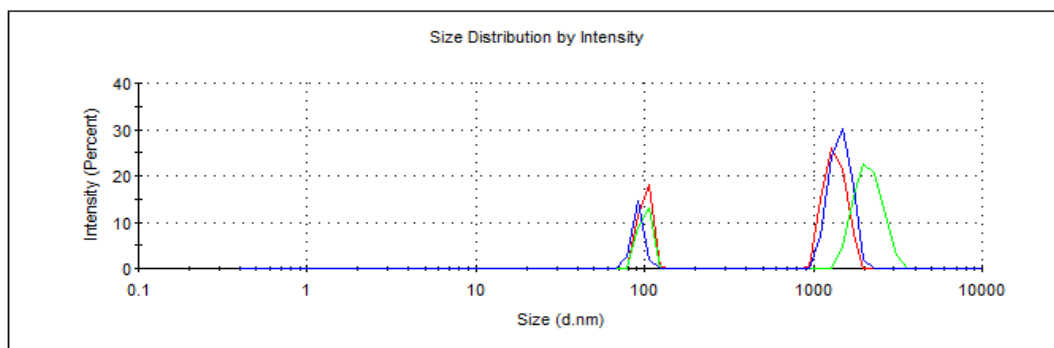
«Сажа 1»; 0,1% масс.



«Сажа 1»; 0,1% масс.



«Сажа 2»; 0,1% масс.



«Сажа 2»; 0,01% масс.

Рисунок 28 – Зависимости интенсивности рассеяния от размера агломератов и частиц сажи

По результатам экспериментальных исследований свойств полученных суспензий УНМ установлено, что в водных суспензиях наиболее легко диспергируются углеродные нанотрубки с меньшим диаметром и большей удельной поверхностью. Вероятно, это связано с особенностями каталитического синтеза, обуславливающими их меньшую спутанность в агломераты.

Для биологических экспериментов были выбраны образцы «МУНТ 2» и «Сажа 2», образующие наиболее стабильные суспензии.

В результате применения ультразвукового подхода к гомогенизации максимумы распределения взвешенных частиц лежат в субмикронном и нанометровом диапазонах, что соответствует поставленной задаче получения однородных высокодисперсных суспензий. Данный способ создания модельных сред был успешно апробирован нами для НЧ Al, Cu, CuO, SiO₂, TiO₂, ZnO, композитов гидроксиапатит-МУНТ и др., что подтверждает его применимость в ходе проведения эколого-биологических исследований НЧ при условии использования свежеприготовленных коллоидных растворов.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК 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 впервые для МУНТ нами была применена модель, рекомендованная Роспотребнадзором РФ (Методические рекомендации..., 2009а).

Согласно указанным рекомендациям был проведен анализ доступной научно-технической информации более чем из 400 статей, обзоров, мета-исследований и нормативно-методических документов о свойствах МУНТ, влияющих на их потенциальную опасность.

Информация об особенностях НМ, содержащаяся в открытых источниках, классифицировалась, систематизировалась и анализировалась в последовательных функциональных блоках в соответствии со значимостью той или иной характеристики. Далее приводится перечень важнейших особенностей НМ, входящих в состав используемой модели (Методические рекомендации..., 2009а).

Физическими характеристиками, которые оказывали влияние на опасность НЧ считались размер и форма частиц. При этом под размером частиц подразумевается минимальный по любому из трёх измерений характерный размер объекта. В частности, для частиц сферической формы размер равен их диаметру, для эллипсоидальных частиц он соответствует меньшей из осей эллипсоидной фигуры, для протяженных волокнистых и трубчатых частиц размер соответствует диаметру волокна или трубки; для плёнок, а также фрактальных образований он равен толщине слоя. Следует отметить, что размер частиц считался существенным показателем, т.к. с его уменьшением при одном и том же содержании материала в единице объёма общее число частиц увеличивается обратно пропорционально размеру в

третьей степени, при этом общая площадь поверхности частиц растёт обратно пропорционально квадрату их размера. При этом возрастает риск опасного воздействия частиц на биообъекты, т.к. важнейшие механизмы токсических эффектов НЧ обусловлены явлениями, локализующимися на межфазных границах.

Такая характеристика, как форма частиц определяется т.н. формфактором – отношением максимального из размеров НЧ по любому из трёх пространственных измерений к минимальному из них. Данный параметр способен варьировать в пределах от 1 (сферические частицы) до 1000 и более (например, нанопроволоки или нанотрубки значительной длины). Формфактор – это существенный показатель, т.к. согласно результатам целого ряда исследований протяженные НЧ с высоким значением показателя формы по сравнению с частицами сферической или эллипсоидной конфигурации значительно менее эффективно удаляются защитными механизмами организма, включая клетки иммунной системы, из экспонированных тканей. При этом увеличивается период контакта НЧ с тканью, что приводит к росту статистической вероятности возникновения токсического эффекта.

К важнейшим физико-химическим характеристикам, которые влияют на потенциальную опасность, рассматривались такие, как растворимость в воде, а также биологических жидкостях; заряд НЧ; их адсорбционная ёмкость; гидрофобность и устойчивость к процессам агрегации; степень адгезии к поверхностям; способность провоцировать генерацию свободных радикалов.

Водорастворимость НМ считалась существенным показателем, определяющим их токсичность. Частицы, образованные растворимыми в воде веществами, при поступлении в водную среду активно диссоциируют с образованием истинных растворов молекулярной или ионной природы, токсичность таких растворов в последствии определяются лишь химическим составом входящих в них компонентов. Можно сказать, что водорастворимые НЧ по сути не отличаются по комплексу своих токсикологических

характеристик от своих химических аналогов традиционной дисперсности. Наоборот, НЧ мало- или нерастворимых в воде веществ могут значительный период времени существовать в свободном состоянии в составе биологических систем, при этом индуцируя токсические эффекты, определяемые параметрами поверхности частиц.

Что касается растворимости НЧ в биологических жидкостях, то она считалась сравнительно менее существенным фактором, поскольку не растворимые в воде частицы, как правило, не диссоциируют и в таких средах, как плазма крови, межклеточная жидкость или цитозоль. Исключением здесь являются высокогидрофобные водонерастворимые УНМ (нанотрубки, фуллерены), в случае которых имеется вероятность повышения растворимости в биологическом окружении за счёт наблюдаемого в белковых растворах эффекта солюбилизации.

Еще одним высоко значимым фактором считался заряд НЧ. Многочисленные исследования свидетельствуют о наибольшей угрозе со стороны положительно заряженных частиц, которые обладают высокой степенью афинности к молекулам нуклеиновых кислот, включая ДНК, и, исходя из этого, значительным потенциалом как индукции генетических нарушений, так и мутагенного действия. В то же время отрицательно заряженные НЧ существенно более безопасны. Однако для таких частиц описана высокая способность проникновения сквозь тканевые барьеры (такие как кожный, кишечный или гематоэнцефалический). К наиболее безопасным можно отнести нейтральные частицы, для которых в минимальной степени характерны токсические эффекты.

В данный момент адсорбционная ёмкость исследована лишь для относительно незначительного числа НЧ. Значение этого фактора может состоять в обеспечении переноса посредством развитой поверхности НЧ различных опасных токсикантов из внешней среды непосредственно внутрь организма. Однако, в связи с тем, что для реализации описанного сценария необходимо обязательное присутствие постороннего токсиканта, значение

показателя адсорбционной ёмкости в процедуре оценки потенциальной опасности НМ сравнительно невелико.

Еще одним фактором, который связан с токсичностью НЧ, считалась их устойчивость к агрегации. Имеются сведения, что в ходе агрегации агрегационно-неустойчивых НЧ происходит уменьшение токсичности последних. Однако, есть данные, что некоторые НМ в виде фрактальных агрегатов не только остаются токсичными, но и становятся существенно более опасными по сравнению с гомогенными макрочастицами аналогичных размеров и массы. Ввиду этих противоречий, в ходе общей оценки опасности значимость характеристики данного фактора считалась сравнительно невысокой.

Гидрофобность НЧ считалась фактором, который усиливает их взаимодействие с клеточными мембранами, а также облегчает проникновение частиц в клетки и замедляющим их выведение из организма. При этом существует значительный массив данных о том, что существенно более токсичными являются гидрофильные НЧ. В связи с этим для общей характеристики токсичности значимость показателя гидрофобности расценивалась как незначительная.

Такой фактор, как адгезия НЧ к поверхности способен усиливать их проникновение сквозь тканевые барьеры, такие, как эпителиальный барьер кишечника по механизму эндоцитоза. При этом данных, которые подтверждали бы связь адгезии НЧ и их токсичности, не получено. Поэтому значение фактора адгезии в ходе оценки опасности считалось относительно невысоким.

Существенным фактором, влияющим на токсические свойства считалась способность частиц генерировать свободные радикалы. Согласно господствующей в настоящее время точке зрения, большая часть повреждающих процессов со стороны НМ как на клеточно-тканевом, так и на организменном уровнях реализуются через механизмы оксидативного стресса – свободнорадикальное перекисное окисление, которое инициируется

посредством активных форм кислорода. Подобные молекулы образуются в ходе гетерогенного химического катализа, локализованного на поверхности НЧ. Поэтому случаи наличия у НМ таких каталитических способностей обладали высокой значимостью в ходе определения общей потенциальной опасности.

В следующем блоке «Молекулярно-биологические характеристики» оценивались характеристики НЧ, заключающиеся в их способности вступать во взаимодействие с макромолекулами и молекулярными комплексами биологического происхождения. В качестве наиболее значимого признака рассматривалось взаимодействие с ДНК, поскольку оно связано с вероятным проявлением генотоксичности и мутагенных свойств НЧ. Еще одним фактором, способствующим поступлению НЧ в клетку может являться их взаимодействие с клеточными мембранами. При этом, по имеющимся в научной литературе сведениям, НМ, которые легко попадают в клетку могут характеризоваться как значительной, так и невысокой степенью цитотоксичности. С учетом этих данных в ходе общей оценки опасности значимость характеристики данного фактора считалась относительно невысокой. Такой фактор, как способность взаимодействовать с белками способен привести к изменению активности ферментов, а также протеомного и метаболомного профилей экспонируемых клеток и тканей под влиянием НЧ. С учетом эффективности процессов элиминации, а также обновления подвергшихся повреждению белков клеток и тканей под воздействием специфических защитных систем (лизосомальные системы на клеточном уровне, ретикуло-эндотелиальная система, функционирующая на уровне целого организма) значение данного фактора рассматривалось как незначительное.

Еще одной существенной группой факторов, которая принималась во внимание в ходе оценке потенциальной опасности МУНТ являлось взаимодействие НЧ с клетками *in vitro*. При этом в качестве высоко значимого фактора рассматривалась способности НМ вызывать злокачественное

перерождение (малигнизацию) экспонированных клеток в культуре (т.н. наличие трансформирующей активности). Способность МУНТ вызывать гибель клеток (как по механизмам некроза, так и апоптоза), а также служить причиной возникновения в них относительно устойчивых морфологических изменений (цитотоксичность) также принималась в качестве значимого фактора. Если говорить об уровнях проявления цитотоксичности, то самыми существенными считались данные о наличии летальных изменений в клетках, являющихся нормальными (нетрансформированными). Затем, по убыванию, устойчивых нелетальных патологий в нормальных клетках, летальных изменений в злокачественно или доброкачественно трансформированных клетках, наконец, о наличии в клетках разнообразных типов морфологических изменений обратимого характера.

Менее значимой, по сравнению с непосредственной цитотоксичностью или трансформирующей способностью НЧ, считалась способность их к накоплению в клетках при условии отсутствия видимого изменения их структуры, что нередко описывается для различных видов НМ. Такие факторы, как изменение протеомного или метаболомного профилей свидетельствуют о наличии способности НЧ воздействовать на экспрессию генов, а также процессы биосинтеза белка и метаболизма. С учетом того, что при переходе на организменный уровень указанные изменения, существенные на уровне клетки, вероятнее всего будут иметь характер адаптации, значимость данного фактора для общей характеристики опасности расценивалась как невысокая.

Токсикологическая характеристика МУНТ составляла следующий блок модели. Весьма существенным фактором, определяющим опасность НМ, служило подтвержденное наличие острой или подострой токсичности при его непосредственном введении в организм животных. Наличие хронической токсичности также являлось существенным для определения общей опасности признаком. Далее в порядке убывания (и роста эволюционной удаленности) приведены токсикологические модели, ответная реакция

которых в максимальной степени иллюстрирует возможные последствия экспозиции НМ человека, а именно: гомойотермные позвоночные (птицы и млекопитающие); пойкилотермные позвоночные (рыбы, амфибии, рептилии); беспозвоночные (черви, моллюски, членистоногие); растения, водоросли, грибы и микроорганизмы. Весьма существенным для оценки опасности НМ фактором признавалось доказанные канцерогенные, мутагенные, иммунотоксические, аллергенные, гонадотоксические, эмбриотоксические, тератогенные эффекты, а также их сочетания.

Биоаккумуляция и задержка НЧ в органах и тканях приводит к увеличению периода взаимодействия нанообъектов с клетками, это теоретически может приводить к росту возможности проявления токсических эффектов. При этом для ряда практически значимых НМ это явление зачастую не приводит к развитию неблагоприятных последствий, в связи с чем значимость данного фактора по сравнению с тремя вышеперечисленными признавалась существенно меньшей.

Поскольку НЧ обладают способностью преодолевать защитные барьеры организма и при этом обладают значительной адсорбционной емкостью, рассматривался такой фактор, как усиление проницаемости барьеров организма для других токсикантов. Однако, т.к. при этом необходимым условием реализации данного механизма токсичности является дополнительное наличие опасных химических веществ или соединений, которые способны адсорбироваться на НЧ, значимость данного признака в ходе оценки опасности НМ была относительно невысокой.

Многие НЧ способны беспрепятственно проходить сквозь кожный покров, легкие, желудочно-кишечный тракт, гемато-энцефалический и гемато-плацентральный барьеры. При этом непосредственной связи данного фактора с наличием у НМ опасных (токсических) свойств не выявлено. Кроме того, достоверно не определено, в какой степени внутриорганизменное поступление высокодисперсных веществ сквозь эпителиальные барьеры эпителиальных тканей можно считать свойственным здоровому организму

физиологическим процессом, который обусловлен проявлением адаптационных реакций. Поэтому значимость этого признака в ходе моделирования опасности МУНТ также считалась невысокой.

Последний из функциональных блоков модели – «Экологическая характеристика» – содержит параметры, которые включают возможность экспонирования, а также наиболее вероятные пути распространения НЧ в экосистемах. Так, мировой объем производства принимался за существенный признак, который характеризует распространение МУНТ и, соответственно, играет значительную роль в ходе оценки потенциальной опасности данного НМ. Вероятность экспонирования человека и объектов живой природы массово производимыми НЧ максимально велика. Для экспериментальных же НМ вероятность экспонирования обычно ограничивается персоналом лаборатории, где синтезируется и исследуется данный материал.

С позиций экологии человека, санитарной и промышленной безопасности важность параметра возможности непосредственно экспонирования людей МУНТ также считалась одной из наиболее существенных. В качестве степеней выраженности данного фактора, по убыванию, рассматривались следующие: а) все население в стране; б) только производители и потребители продукции, содержащей НМ; в) только персонал нанотехнологических производств; г) только персонал исследовательских и производственных центров и лабораторий, связанных с разработкой и изучением НМ.

Что касается возможности попадания НЧ в организм через пищевые цепочки (например, с загрязненной сельхозпродукцией), то данный путь является не прямым, поэтому значимость фактора накопления НМ в организмах считалась ниже по отношению к прямой экспозиции. При этом использовалась шкала выраженности опасности, основанная на «антропоном» принципе – в связи с близостью в цепи питания каждой из рассматриваемых групп к человеку: а) сельскохозяйственные растения и домашние животные; 2) наиболее массовые обитатели экосистем – растения, животные,

микроорганизмы; 3) немногочисленные виды, индифферентные с позиций хозяйственной деятельности; 4) вредители сельского хозяйства – сорняки, растительноядные насекомые и т.д.

Наконец, роль сведений о накоплении МУНТ в почве, водах и донных отложениях позиционировалась как менее значимая по сравнению с вышеописанным фактором, поскольку в данном случае недоказанной остается доступность НЧ, попавших в абиотические среды для живой составляющей экосистем, участвующей в переходе НМ по пищевым цепям.

Таким образом, в ходе оценки потенциальной опасности МУНТ были использованы основные критерии, входящие в состав используемой модели (Методические рекомендации..., 2009а).

После объединения данных о потенциальной опасности МУНТ в составе функциональных блоков модели (Табл. 9) был проведен расчет величин частных опасностей.

Таблица 9 – Данные для выявления потенциальной опасности МУНТ

| 1. Блок. Геометрические характеристики | | | | | |
|--|---|----------|--------|--|-----------|
| №№ п/п | Признаки | Ран г | φ | Оценка | Балл R |
| 1 | Минимальный размер частицы в одном из измерений | 1 | 2 | Преобладают частицы менее 50 нм | 4 |
| 2 | Формфактор (отношение максимального размера к минимальному) | 1 | 2 | Частицы крайне несферичны (формфактор>100) | 4 |
| 2 Блок. Физико-химические свойства | | | | | |
| 1 | Растворимость в воде | 1 | 2 | Нерастворимы | 4 |
| 2 | Растворимость в биологических жидкостях | 2 | 1 | Малорастворимы | 2 |
| 3 | Заряд | 1 | 2 | Положительный | 4 |
| 4 | Адсорбционная ёмкость | 3 | 0,75 | Неизвестно | 2,5 |
| 5 | Устойчивость к агрегации | 3 | 0,75 | Высокая | 4 |
| 6 | Гидрофобность | 4 | 0,5 | Гидрофобны | 4 |
| 7 | Адгезия к поверхностям | 5 | 0,3125 | Неизвестно | 2,5 |
| 8 | Способность генерировать свободные радикалы | 2 | 1 | Выявлена | 4 |
| 3 Блок. Молекулярно-биологические свойства | | | | | |
| 1 | Взаимодействие с ДНК | 1 | 2 | Выявлено | 4 |
| 2 | Взаимодействие с белками | 3 | 0,75 | Неизвестно | 2,5 |
| 3 | Взаимодействие с мембранами | 2 | 1 | Выявлено | 4 |
| 4 Блок. Цитологические свойства | | | | | |
| 1 | Способность к накоплению | 2 | 1 | Накапливается | 3 |

| | | | | | |
|----------------------------------|---|---|------|---|-----|
| | в клетках | | | только в органеллах | |
| 2 | Трансформирующая активность | 1 | 2 | Неизвестно | 2,5 |
| 3 | Влияние на протеомный и(или) метаболомный профиль | 3 | 0,75 | Выявлена | 4 |
| 4 | Токсичность для клеток | 1 | 2 | Вызывает летальные изменения в нормальных клетках | 4 |
| 5 Блок. Физиологические свойства | | | | | |
| 1 | Проникновение через барьеры организма | 4 | 0,5 | Выявлено | 4 |
| 2 | Накопление в органах и тканях | 2 | 1 | Накапливается в отдельных органах и тканях | 3 |
| 3 | Усиление проницаемости барьеров организма для посторонних токсикантов | 3 | 0,75 | Неизвестно | 2,5 |
| 4 | Острая токсичность | 1 | 2 | 3 класс (умеренно опасно) | 2 |
| 5 | Хроническая токсичность | 1 | 2 | Токсично для человека и теплокровных животных | 4 |
| 6 | Специфические и отдалённые эффекты | 1 | 2 | Неизвестно | 2,5 |

| | | | | | |
|--------------------------------------|--|---|------|--|---|
| | токсичности (канцерогенный, мутагенный, тератогенный, гонадотоксический, эмбриотоксический, иммунотоксический. аллергенный) | | | | |
| 6 Блок. Экологическая характеристика | | | | | |
| 1 | Массовость производства в мире | 1 | 2 | Массовый продукт (1-1000 т) | 3 |
| 2 | Возможность экспонирования людей (категории населения) | 1 | 2 | Персонала массового производства | 2 |
| 3 | Данные о накоплении в организмах | 2 | 1 | Выявлено | 4 |
| 4 | Данные о накоплении в объектах внешней среды (почвы, грунтовые воды, донные отложения) | 3 | 0,75 | Выявлено | 4 |

Величины частных опасностей по блокам составили:

Блок 1: $D_1 = 1,000$

Блок 2: $D_2 = 0,908$

Блок 3: $D_3 = 0,925$

Блок 4: $D_4 = 0,724$

Блок 5: $D_5 = 0,856$

Блок 6: $D_6 = 0,739$

После этого был произведен расчет показателя опасности НМ D (Табл. 10), значение которого составило 2,270.

Таблица 10 – Оценка степени потенциальной опасности МУНТ

| Название блока 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 D | 2,270 (высокая степень потенциальной опасности) | | | | | |

Полученное значение коэффициента неполноты $U=0,162$, учитывавшего неопределенность ответов в блоках 2-5, указывает на достоверность проведенной оценки. Анализ данных таблиц 9 и 10 позволяет заключить, что НМ обладает высокой степенью опасности и данная оценка достоверна.

Согласно используемым руководствам (Методические рекомендации... 2009а), была установлена необходимость проведения полного комплекса исследований безопасности изучаемого материала. Дальнейшие экспериментальные исследования (разделы 5-7) позволили подтвердить правильность результатов моделирования.

5 ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БАКТЕРИИ И ГИДРОБИОНТЫ

Для выявления воздействия МУНТ на эффективность процессов биодеструкции и функционирования водных экосистем было проведено биотестирование наноматериала с использованием представляющих различные эколого-функциональные группы тест-объектов – бактерий, ракообразные, членистоногие и микроводоросли.

Негативный эффект по отношению к бактериям *E.coli* и *B. cereus* начинал проявляться уже в концентрации 1 мг/л, в дальнейшем следует нелинейное изменение токсичности МУНТ, достигающее максимума при концентрации 1 г/л (Табл.11).

Таблица 11 - 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 |

Неравномерная динамика изменения биологических свойств, описанная и для других НЧ (Browning et al., 2009; Iavicoli, et al., 2010; Nascarella, Calabrese, 2012; Iris et al., 2014), не позволила определить полуметаллы и безопасные концентрации МУНТ для *E.coli* и *B. cereus*. Однако на тест-системе «Эколюм» (*E. coli* М-17), объектах *C.affinis*, *Sc.quadricauda* и *Ch.riparius* получены линейные зависимости «доза-эффект» (Табл. 12). Это может быть связано с меньшим периодом экспозиции, поскольку с течением времени НЧ в коллоидных системах могут коагулировать и менять активность.

Таблица 12– Воздействие МУНТ на тест-объекты

| Тест-объект | Концентрация коллоидного раствора МУНТ (мг/л) | | | | | Класс опасности |
|------------------------|---|----|---|-----|------|-----------------|
| | 100 | 10 | 1 | 0,1 | 0,01 | |
| Тест-система «Эколюм» | 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 – гибель организмов, 1 – организмы выжили

Далее представлены результаты определения класса опасности исследуемого УНМ относительно использованных тест-объектов (Табл. 12).

Биотестирование МУНТ на *C. affinis* показало, что НМ оказывает токсическое действие без разведения и при разведении в 10 раз. При разведении в 100 раз (концентрация 1 мг/л) он не токсичен. Безвредная кратность разведения < 100 раз, следовательно, материал относится к IV классу опасности для ОПС или малоопасным веществам.

Что касается *Ch. riparius*, установлено, что суспензия МУНТ оказывают токсическое действие только без разведения. Однако, поскольку по отношению к данному тест-объекту исследуемый материал обладает свержкумуляцией (см. далее), его также можно отнести к IV классу опасности для ОПС или малоопасным веществам.

Исследование воздействия МУНТ на тест-объект *Sc. quadricauda* показало, что НМ токсичен в концентрациях 100, 10 и 1 мг/л; в концентрации 0,1 мг/л (разведение в 1000 раз) он не оказывает токсического действия. Безвредная кратность разведения находится в интервале 101-1000 раз, что позволило отнести изучаемый материал к III классу опасности для ОПС или умеренно опасным веществам.

Наконец, результаты оценки токсичности с помощью биосенсора «Эколюм» показали, что НМ оказывает токсическое действие на тест-систему

в концентрациях 100 , 10%, 1 и 0,5 мг/л, а в концентрации 0,1 мг/л (разведение в 1000 раз) токсическое действие отсутствует. Безвредная кратность разведения водной дисперсии находится в интервале 101–1000 раз, следовательно, изучаемый материал относится к III классу опасности для ОПС или умеренно опасным веществам.

Таким образом, согласно результатам биотестирования на бактериях и гидробионтах, МУНТ относятся к умеренно опасным веществам. Это соответствует классу опасности такого УНМ, как сажа (<http://www.fkko.ru>). Относительно невысокая токсичность МУНТ в острых экспериментах согласуется с результатами других исследований (Kang et al., 2008, 2009).

Расчеты полулетальных и безвредных концентраций показали, что наименее чувствительными к действию МУНТ являются личинки *Ch. riparius* и цериодафнии *C. affinis*, а максимальная рефлексия установлена для бактерий и водорослей (Табл. 13). Наибольший токсический эффект был отмечен для *E. coli* М-17. Это подтверждает имеющиеся данные о бактерицидной активности УНМ (Kang et al., 2008; Dong et al., 2012). Наименьшее пороговое значение установлено для микроводорослей *Sc. quadricauda* и составляет 2 мг/л. Можно заключить, что безопасные для гидробионтов и бактерий концентрации МУНТ лежат ниже этого значения.

Таблица 13 – Значения полулетальных и безвредных концентраций МУНТ

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

Следует отметить, что установленный класс опасности МУНТ (см. Табл. 12), является «умеренно-опасным». Таким образом, экспериментальные данные не подтверждают результаты концептуального моделирования (раздел 4). Однако итоги цитогенетических исследований указывают на возможные отдаленные эффекты, связанные с нарушениями работы хромосом.

Биотестирование МУНТ на организменном и субклеточном уровнях личинок хирономид показало возрастание токсического эффекта в связи с повышением концентрации и экспозиции исследуемого материала.

Выявлено, что личинки хирономид являются высокоустойчивыми к токсическому действию УНТ. Значение полулетальной концентрации НТ (ЛК₅₀₋₉₆) для них составляет 86 г/л, БК₁₀ – 52 г/л, LT₅₀=60ч., – согласно этим данным исследуемый раствор обладает сверхкумуляцией (Табл. 14) и его можно отнести к IV классу опасности.

Таблица 14– Показатели кумуляции углеродных нанотрубок «Таунит» при воздействии на личинок *Ch. riparius* в остром эксперименте

| Степень кумуляции | Показатели кумуляции TL ₅₀ , ч |
|-------------------|---|
| 1. Сверхкумуляция | >48 |
| 2. Сильная | >24-48 |
| 3. Средняя | 12-24 |
| 4. Слабая | <12 |

Изменение активности ядрышкового организатора (ЯО) политенных хромосом хирономид было выбрано в качестве ведущего критерия для оценки цитогенетических эффектов УНМ, т.к. этот участок хромосом работает в 99 % клеток (Фёдорова, 2009), отвечает за поддержание в клетке гомеостаза и является сенсором многих стрессовых воздействий, а нарушение его функций приводит к апоптозу и гибели клеток (Зацепина, 2007). Известно, что ответная реакция ЯО на действие стрессовых факторов специфична и служит индикатором биологической активности на клеточном и субклеточном уровнях (Зацепина, 2007).

Активность ЯО достоверно увеличивается при всех концентрациях и экспозициях (кроме 48 ч.) коллоидных растворов МУНТ (Рис. 29). Наибольшее значение индекса отмечено при действии НМ в концентрации 50 мг/мл при 24-часовой экспозиции (Рис. 30). Такой эффект свидетельствует о включении краткосрочных механизмов клеточной гиперкомпенсации в период первичного отклика в ответ на стрессовое воздействие для восстановления гомеостаза соматических клеток. При этом реакция на субклеточном уровне (изменение величины индекса активности ЯО) является более чувствительной и информативной по сравнению с реакцией на организменном уровне (гибель подопытных особей).

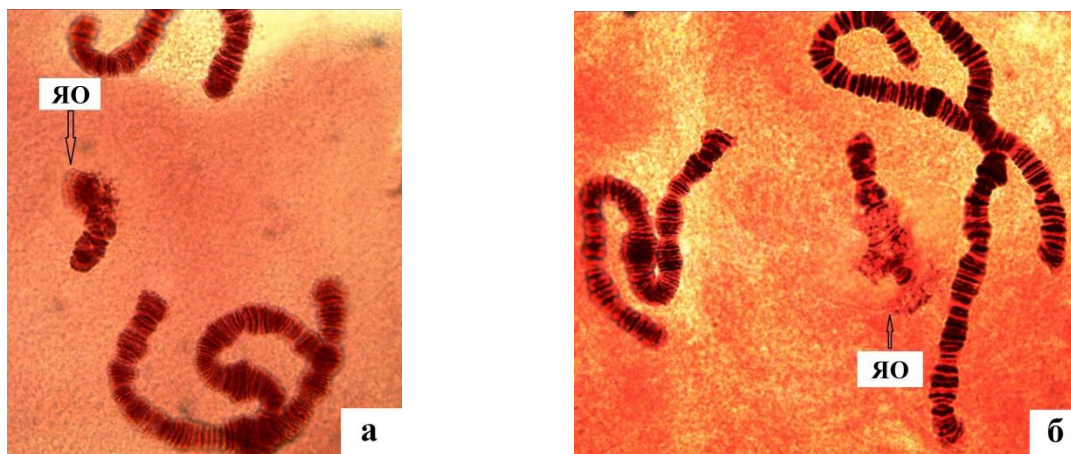


Рисунок 29 – Влияние МУНТ на активность ядрышкового организатора IV хромосомы *Ch. riparius* а) контроль – 24 ч.; б) возрастание функциональной активности при концентрации МУНТ 50 г/л – 24 ч.

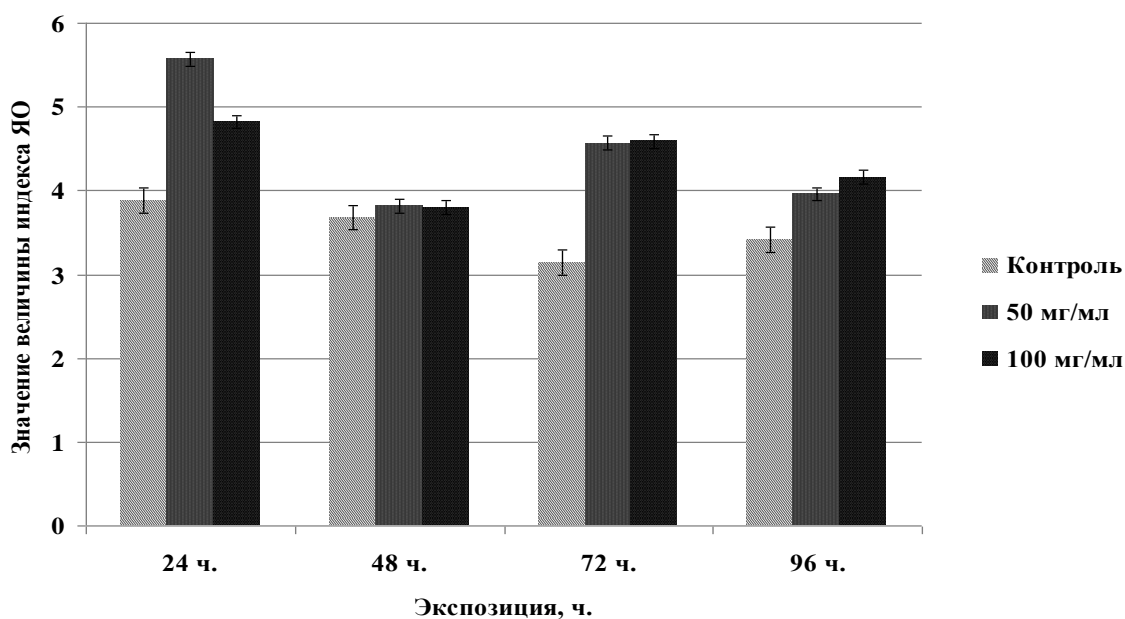


Рисунок 30 –Изменение величины индекса активности ядрышкового организатора при действии МУНТ

Отмечено увеличение (на 15,61-47,26%) активности ядрышкового организатора политенных хромосом клеток слюнных желез личинок хирономид при воздействии суспензий МУНТ. Это свидетельствует о

включении краткосрочных механизмов клеточной гиперкомпенсации для восстановления гомеостаза соматических клеток (Зацепина, 2007). При этом реакция на субклеточном уровне является более чувствительной по сравнению с реакцией на организменном уровне, т.к. данный тест-объект оказался наиболее резистентным к действию НМ.

Дискуссионным является вопрос о механизмах токсического воздействия УНМ на бактерии и представителей зоо- и фитопланктона. Рассматриваются возможности повреждения наноразмерными частицами мембран клеток, развития окислительного стресса в ответ на проникновение в клетку чужеродных материалов (Chad et al., 2010) или механического воздействия агломератов НЧ на органы дыхания ракообразных и личинок насекомых (Колесникова и др. 2011).

Таким образом, проведена оценка острого токсического действия МУНТ на личинки хирономид, цериодафнии, одноклеточные зеленые водоросли и бактерии. Установлено, что исследуемый УНМ относится к III классу опасности для ОПС (умеренно опасные вещества). Организмами, наиболее устойчивыми к действию МУНТ, оказались личинки хирономид, наименее устойчивыми – микроводоросли и бактерии. Отмечены выраженные цитогенетические эффекты НЧ. Показано, что безопасные концентрации УНМ в водной среде лежат в диапазоне ниже 2 мг/л.

Полученные результаты могут быть учтены при разработке норм безопасности при производстве, хранении, транспортировке, эксплуатации и утилизации продукции, содержащей УНМ. 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.

6 ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК К БИОАККУМУЛЯЦИИ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ И СОПУТСТВУЮЩИЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

6.1 Влияние многостенных углеродных нанотрубок на показатели всхожести и морфометрические параметры эспарцета песчаного

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 УНМ в функционировании наземных экосистем.

В ходе исследования влияния МУНТ на процессы раннего онтогенеза *O. arenaria* отмечено подавление исследуемым материалом прорастания семян (Рис. 31). Под действием МУНТ исследуемые показатели уменьшались на 21,74–39,13%. Минимальные показатели прорастания и всхожести наблюдались в вариантах с другой аллотропной модификацией углерода (сажей) – уменьшение на 32,61 – 80,56%.

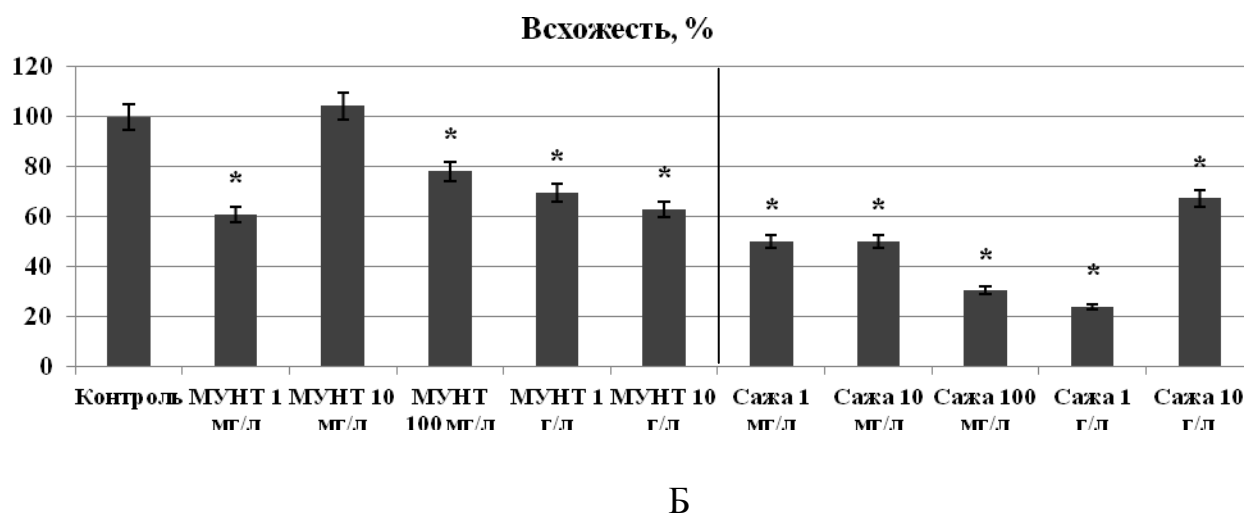
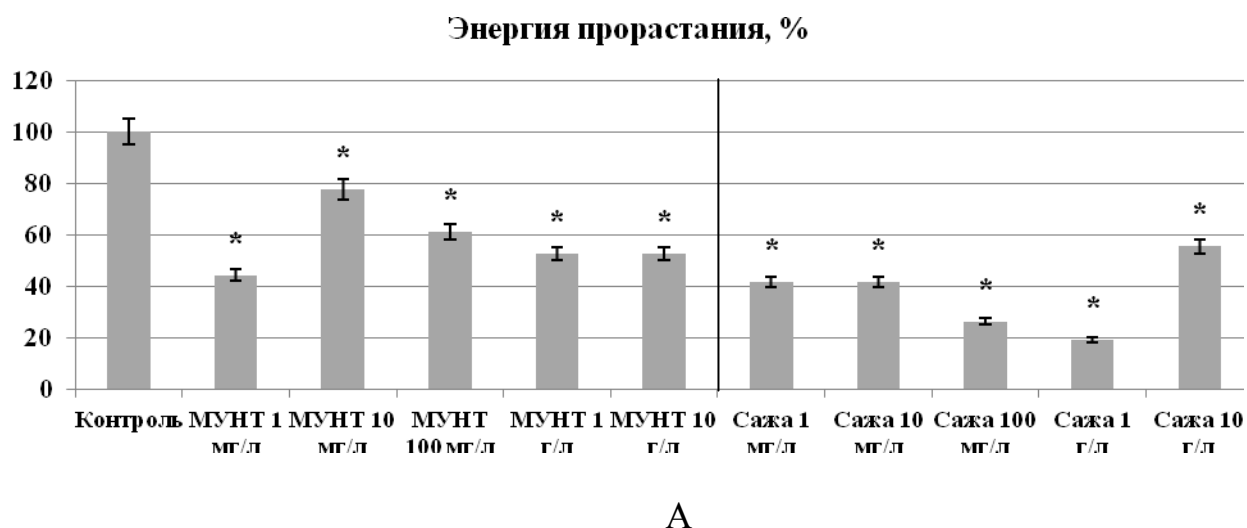
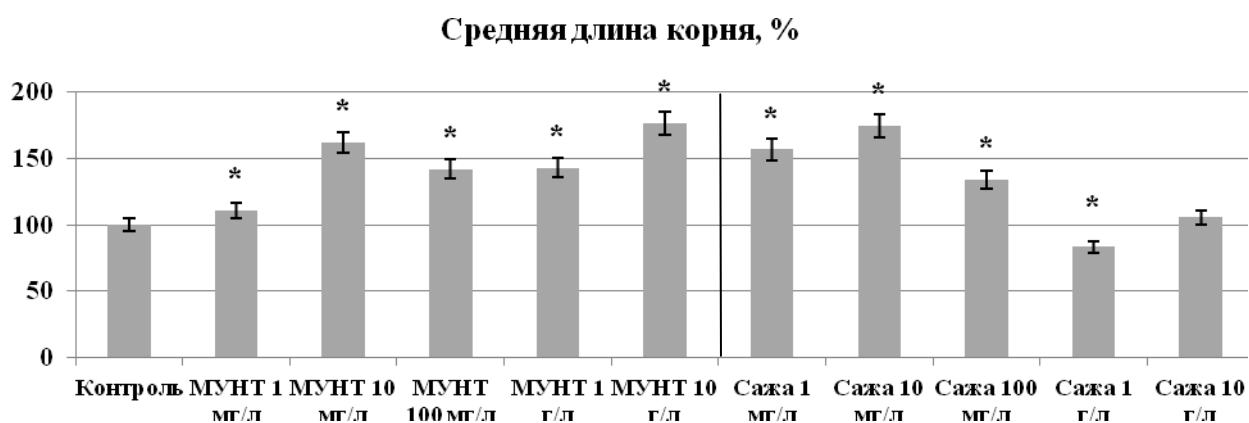


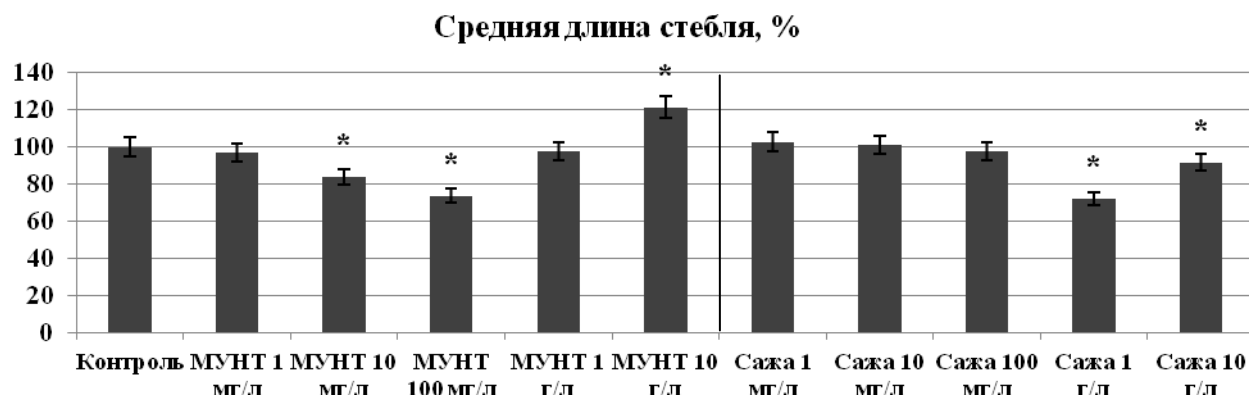
Рисунок 31 – Влияние МУНТ на энергию прорастания (А) и всхожесть (Б) семян *O. arenaria* (здесь и далее в разделе знаком * обозначены варианты, в которых отмечено достоверное различие с контрольными значениями при $p < 0,05$)

Анализ морфометрических параметров указывают на то, что МУНТ усиливают рост корней эспарцета (Рис. 32 (А)). Это возможно объясняется выдвинутой в работе Ходаковской (Khodakovskaya, 2009) гипотезой об увеличении поступления воды вследствие «пронзания» кожицы семян УНТ. Наибольший прирост корня отмечен при максимальной концентрации МУНТ (на 76,7%). Внесение в культивационную среду сажи также стимулирует прирост корней, за исключением концентрации 1 г/л, где зафиксирован

минимальный показатель длины корня – на 16,6% меньше контрольного значения. Развитие стебля подавлялось при средних концентрациях МУНТ (– 16,3 – 26,4 %), однако при 10 г/л наблюдалось увеличение средней длины стебля на 21,5% (Рис. 32 (Б)). Сажа в низких и средних концентрациях не оказывала достоверного влияния на развитие стебля, в то же время, при 1 и 10 г/л отмечены показатели ниже контрольных на 28 и 8% соответственно.



А



Б

Рисунок 32 – Влияние МУНТ на развитие проростков *O. arenaria*: (А)– корни; (Б)– стебли

Можно отметить, что действие МУНТ на растения нелинейно связано с концентрацией и отличается от действия углерода другой аллотропной модификации (сажи).

6.2 Результаты микроскопического исследования

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 локализуются как на поверхности корней проростков, так и во внутренних зонах корней и листьев, присутствуют в клетках и межклеточном пространстве (Рис. 33(А, В); 34(А, В)).

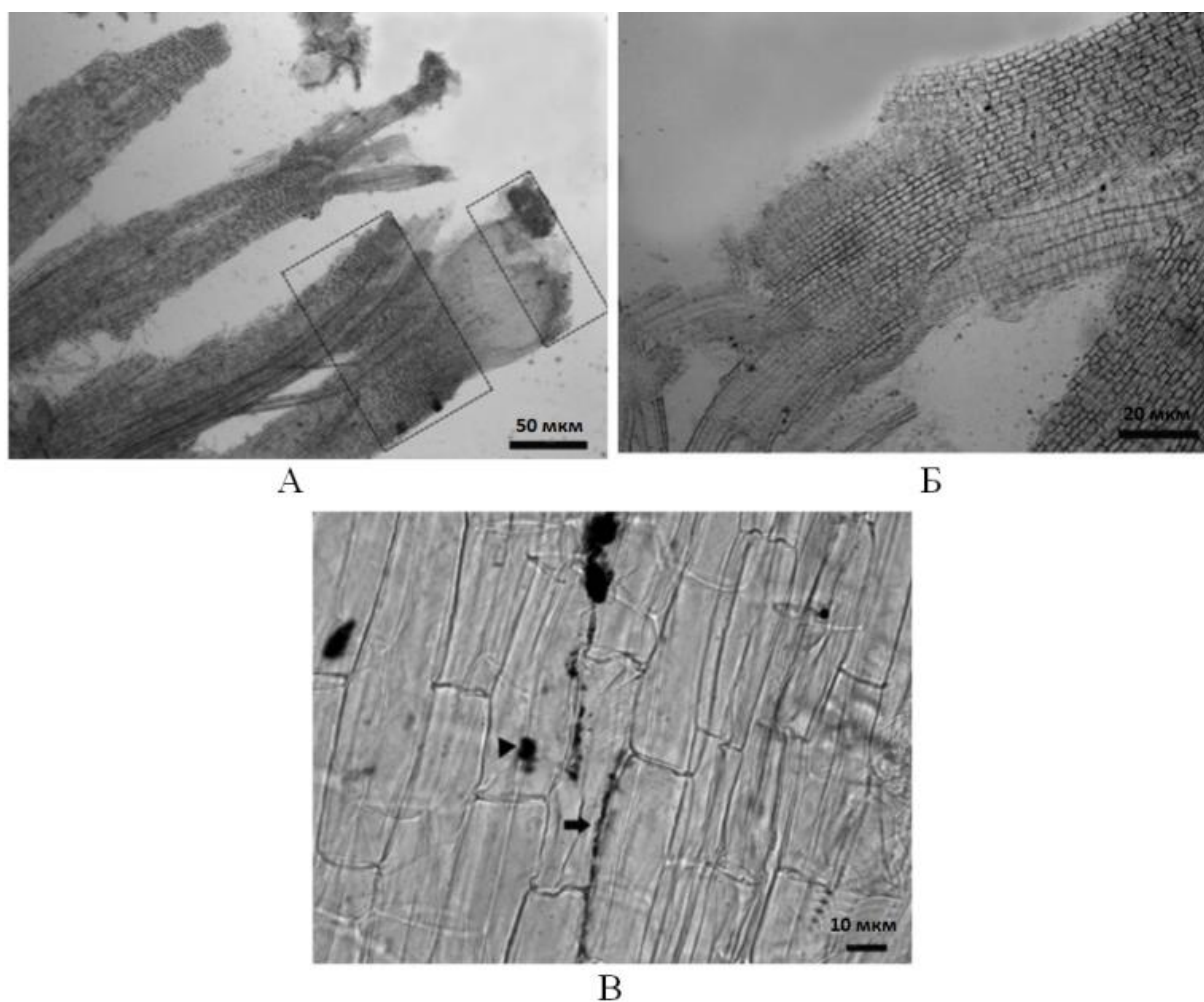


Рисунок 33 – Препарат распластанного корня эспарцета. А – В корне УНМ распределяется неравномерно, и области более интенсивного накопления выделены прямоугольными вставками. УНМ декорируют межклетники чехлика, зоны дифференцировки и проводящие пучки.

Масштаб 50 мкм. Б – Включение УНМ в межклетники зоны дифференцировки. Масштаб 20 мкм. В – Крупные скопления УНМ локализованы в межклетниках (стрелка) и клетках (треугольная стрелка). Масштаб 10 мкм.

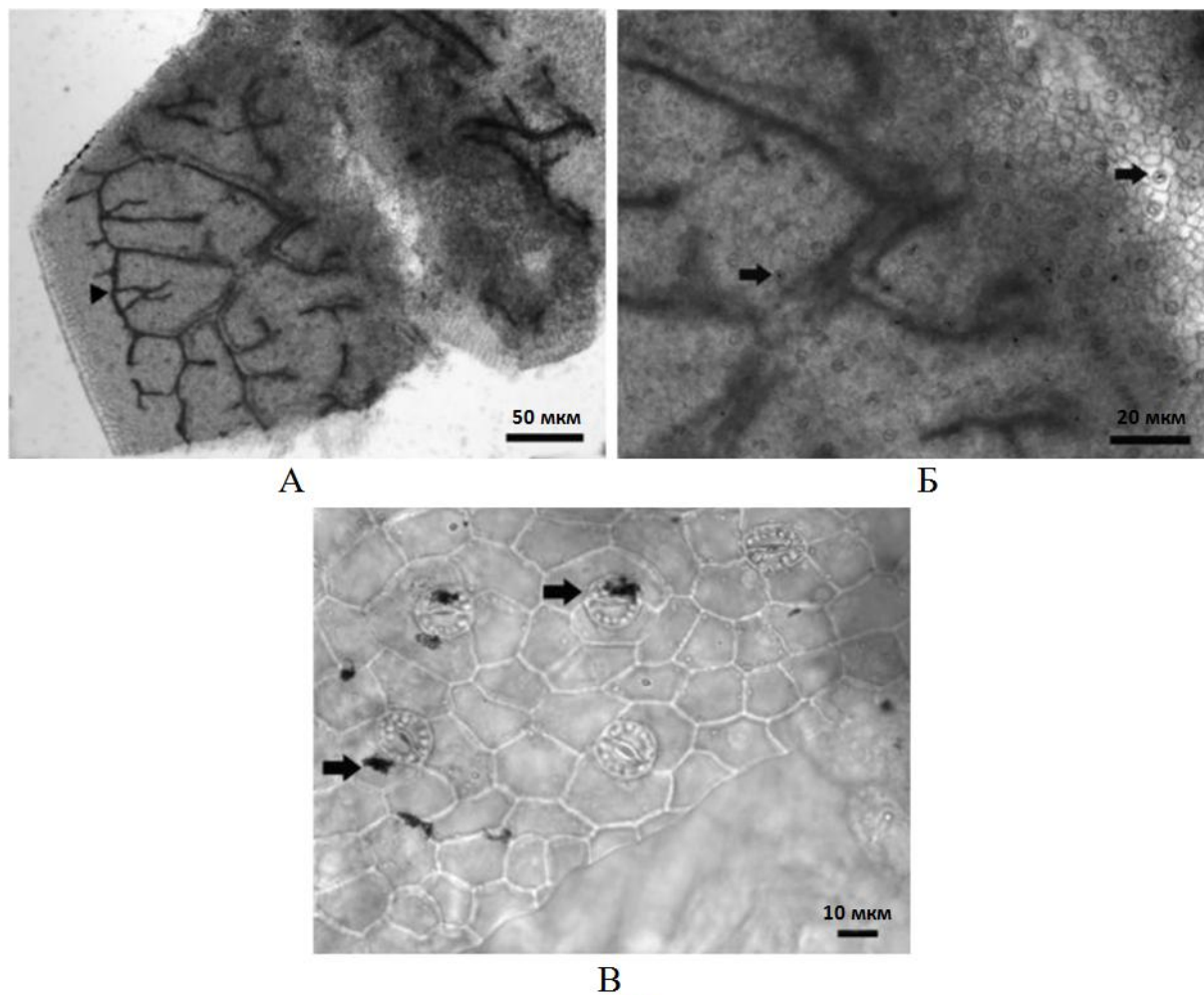


Рисунок 34 – Препарат распластанного участка листа эспарцета. А – УНМ декорируют проводящие пучки (треугольная стрелка). Масштаб 50 мкм. Б – УНМ окрашивают проводящие пучки и локализуются в устьицах (стрелки). Масштаб 20 мкм. В – УНМ выявляются в замыкающих клетках устьица и в клетках эпидермиса (стрелки). Масштаб 10 мкм.

Ультратонкие срезы, приготовленные из участков органов растений, которые по данным световой микроскопии аккумулировали черные конгломераты, дополнительно исследовали методами электронной микроскопии.

Анализ ультратонких срезов корней и листьев проростков групп 100 и 1000 мг/л показал, что НЧ находятся как на поверхности, так и внутри органов проростков. Адсорбция МУНТ на поверхности корешка (Рис. 35 А) согласуется с данными других исследователей (Ma et al., 2010; Wild, Jones, 2009; Lin et al., 2009). При этом скопления и одиночные МУНТ разной длины обнаруживаются также в клетках корня (Рис. 35 Б, В) и листа (Рис. 36 А-В). Нанотрубки, лежащие в плоскости среза, уверенно распознаются с помощью ПЭМ по характерным морфологическим особенностям. Однако если МУНТ расположены поперек или под большим углом к плоскости среза, то остающиеся в срезе фрагменты МУНТ трудно отличить от различных электронно-плотных эндогенных включений. В этих случаях для идентификации МУНТ в тканях растений можно использовать метод дифракции электронов (Рис. 35Г, 36Г). При наложении электронограмм видно, что все дифракционные кольца на электронограмме биологических образцов (Рис. 35Д, 36Д) совпадают с кольцами на электронограмме эталона (см. раздел 3), что также подтверждает присутствие МУНТ в клетках растений. Отдельные дополнительные рефлекссы на электронограммах объясняются наличием в тканях растений эндогенных кристаллических включений, вероятно, не связанных с бионакоплением УНМ.

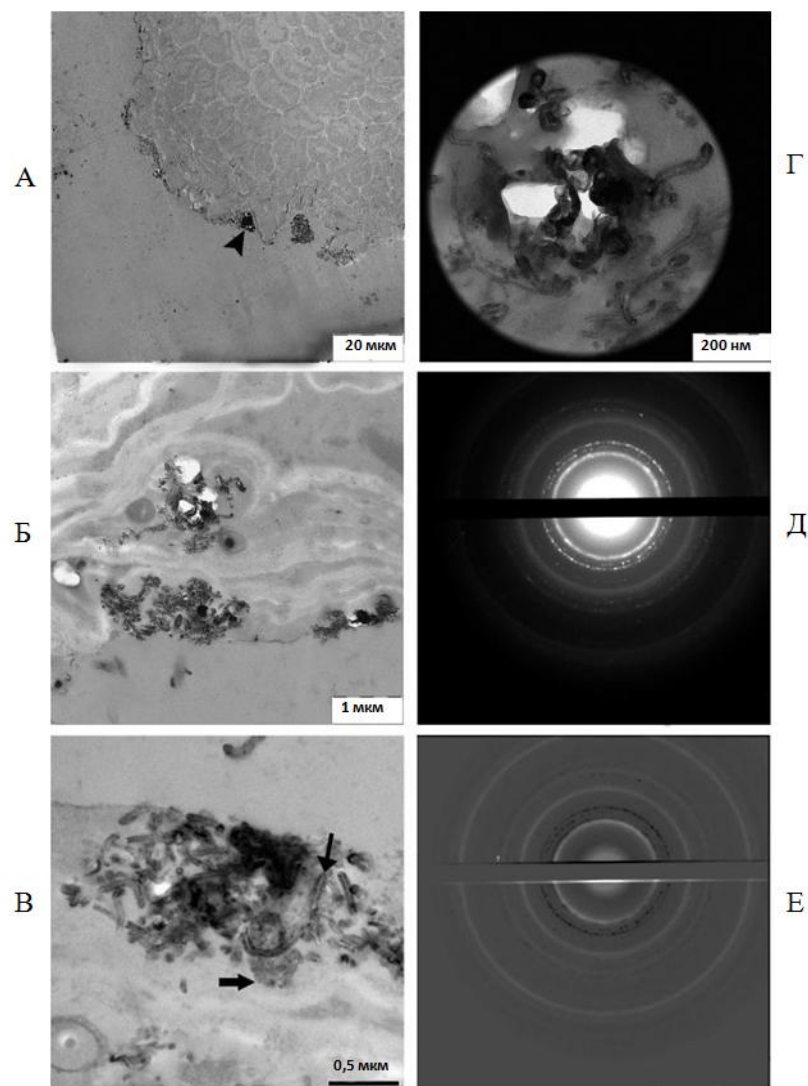


Рисунок 35 – Электронномикроскопический анализ ультратонких срезов корня эспарцета после инкубации с УНМ. А – На поверхности корня присутствуют скопления УНМ, одно из них показано стрелкой. Б – Скопления УНМ на поверхности и в клетках корня. В – Скопления УНМ в клетках состоят из нанотрубок (тонкая стрелка) и мелкодисперсного электронно-плотного материала (толстая стрелка). Г – Участок корня, содержащий УНМ и выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. Д – Электронограмма анализируемой области. Е – Совмещение электронограммы эталона УНМ (см. раздел 3), и инвертированного изображения электронограммы УНМ в клетке корня проростка (Д). Совпадающие рефлексы и кольца на этой электронограмме – белые; рефлексы, отсутствующие на электронограмме эталона УНМ – черные.

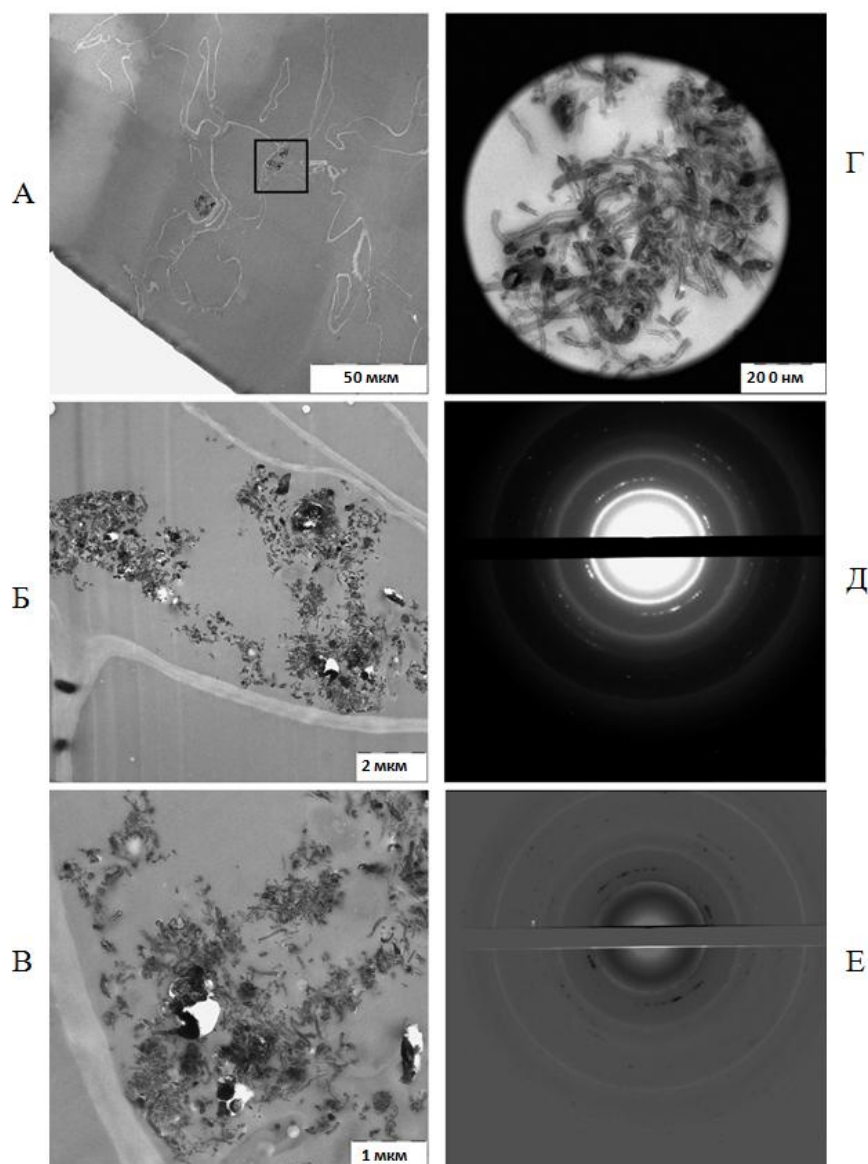


Рисунок 36 – Электронномикроскопический анализ ультратонких срезов листа эспарцета после инкубации с УНМ. А – Участок листа с двумя скоплениями УНМ в клетках. Участок, выделенный в прямоугольной рамке, показан на большем увеличении на Б и В. Б, В – УНМ состоит из нанотрубок и мелкодисперсного электронно-плотного материала. Г – Участок листа, выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. Д – Электронограмма анализируемой области. Е – Совмещение электронограмм образца (см. раздел 3), и инвертированного изображения электронограммы УНМ в клетке листа проростка (Д). Совпадающие рефлексы и кольца на этой электронограмме – белые; рефлексы, отсутствующие на электронограмме эталона УНМ, – черные.

Наблюдавшееся нами внедрение МУНТ в цитоплазму опровергает мнение некоторых авторов, предполагающих, что неспособность МУНТ к проникновению в клетки связана с большим диаметром МУНТ по сравнению с ОУНТ, проникновение которых в клетки растений было установлено ранее (Wild et al., 2009; Liu et al., 2009). В исследовании группы Лахиани (Lahiani et al., 2013) описывалось проникновение МУНТ под кожицу семян зерновых культур, что указывает на возможность переноса МУНТ на более высокие трофические уровни по пищевым цепям.

Результаты нашей работы однозначно подтверждают факт фитоаккумуляции МУНТ, что представляет интерес как с позиций экологической безопасности, так и для таких отраслей, как растениеводство и биотехнологии, поскольку на базе углеродных НЧ могут быть созданы эффективные наноконтейнеры для доставки разнообразных молекул в клетки растений (Khodakovskaya et al., 2009).

В ходе настоящего исследования наблюдалась повышенная концентрация МУНТ в районе устьиц, что указывает на важную роль процесса транспирации в бионакоплении НЧ. Впервые отмеченная нами способность МУНТ к проникновению и биоаккумуляции в растениях указывает на высокую потенциальную опасность данного материала и подтверждает результаты проведенного моделирования (раздел 4).

6.3 Результаты анализа биохимического статуса растений

Анализ влияния МУНТ на антиоксидантную систему проростков эспарцета показал снижение активности каталазы при всех концентрациях УНМ, за исключением группы «МУНТ 1 г/л», в которой отмечалось увеличение исследуемого показателя (Рис. 37). Наименьшая активность фермента (в 1,5 – 2 раза ниже контрольного значения) наблюдалась при минимальной и максимальной концентрации МУНТ, что может быть связано

со ступенчатым характером процесса адаптации растительного организма к воздействию НЧ.

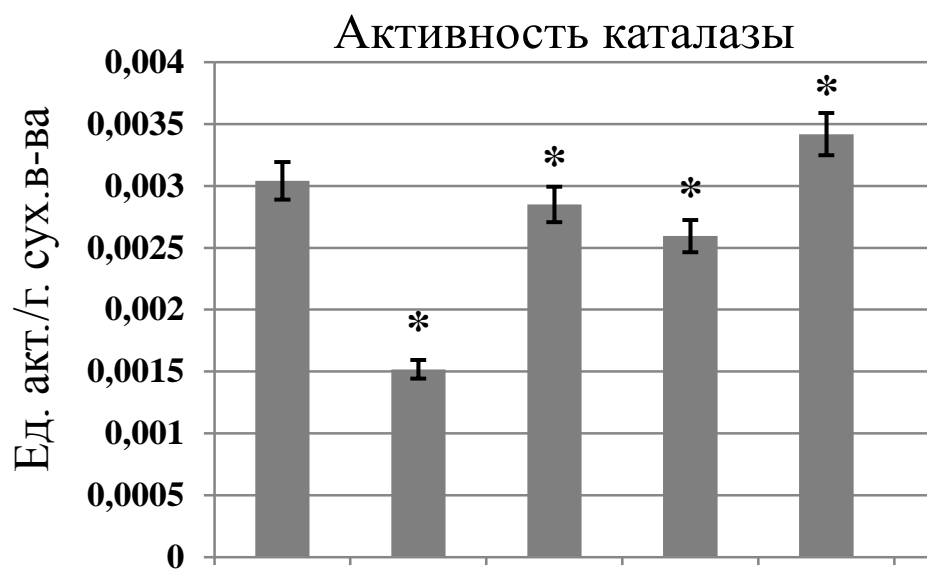


Рисунок 37 – Влияние МУНТ на активность каталазы в проростках *O. arenaria*

Показатели активности пероксидазы в проростках эспарцета под действием МУНТ достоверно не отличались от контрольных значений (Рис. 38).

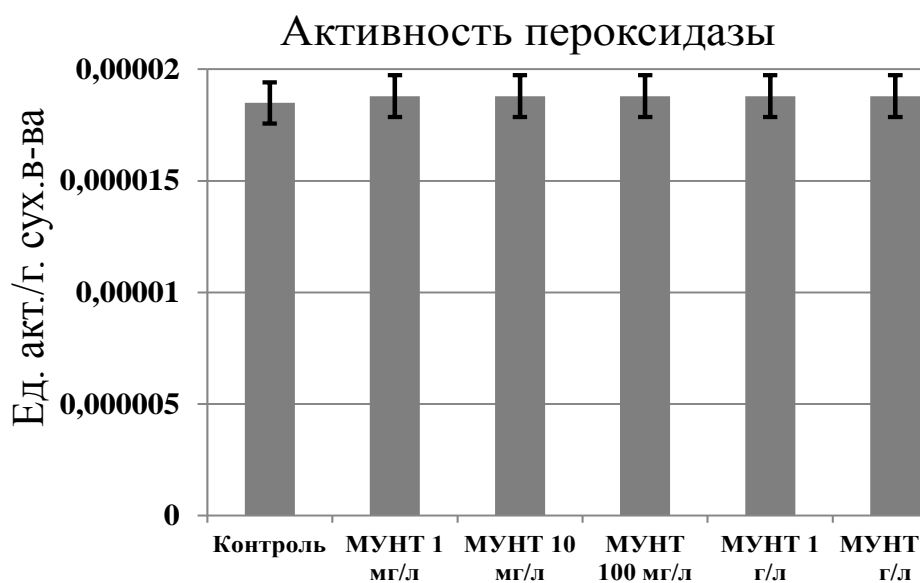


Рисунок 38 – Влияние МУНТ на активность пероксидазы в проростках *O. arenaria*

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. 39). Отмеченные изменения активности ферментов антиоксидантной системы согласуются с результатами работы Косолаповой с соавторами (Косолапова и др., 2010) и, вероятно, свидетельствует о возникновении окислительного стресса под действием УНТ. Продукция активных форм кислорода в ответ на поступление в организм НЧ является одним из предполагаемых механизмов их токсичности (Begum et al., 2012).

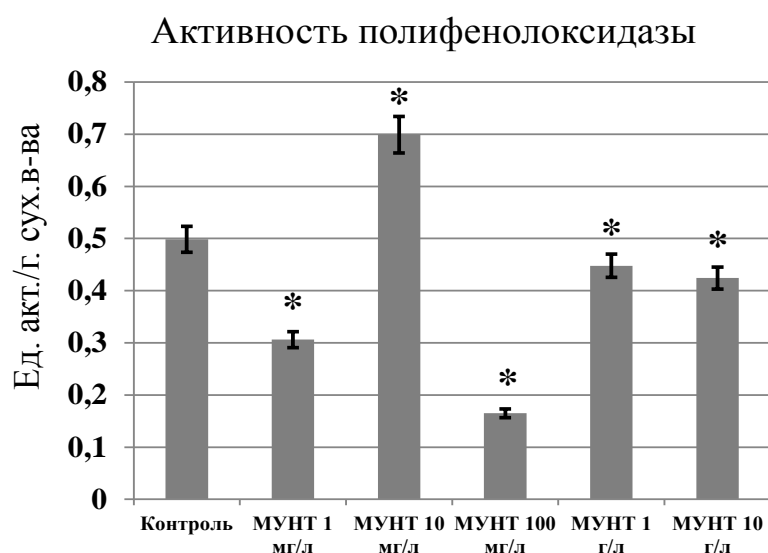


Рисунок 39 – Влияние МУНТ на активность полифенолоксидазы в проростках *O. arenaria*

Минимальные значения содержания хлорофиллов a,b и каротиноидов зафиксированы в группах «МУНТ 10 мг/л» и «МУНТ 10г/л», максимальное – наблюдалось в группе «МУНТ 1 мг/л» (Рис. 40). 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.

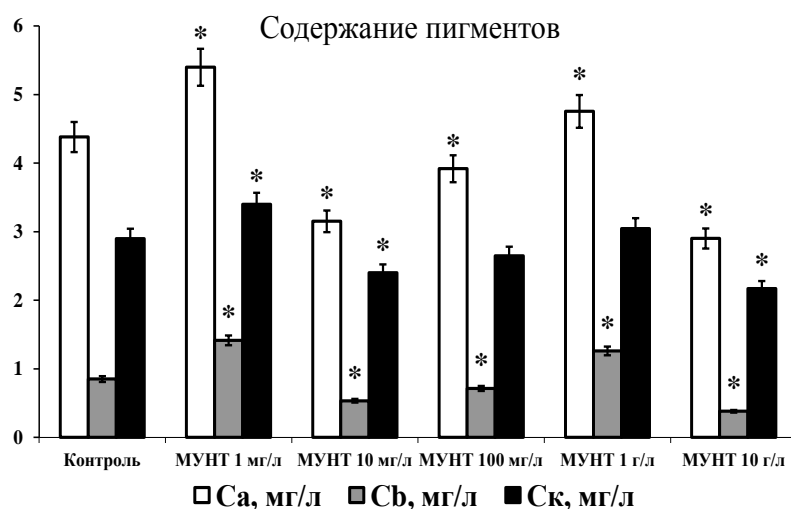


Рисунок 40 – Влияние МУНТ на содержание пигментов в проростках *O. arenaria*

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. 41).

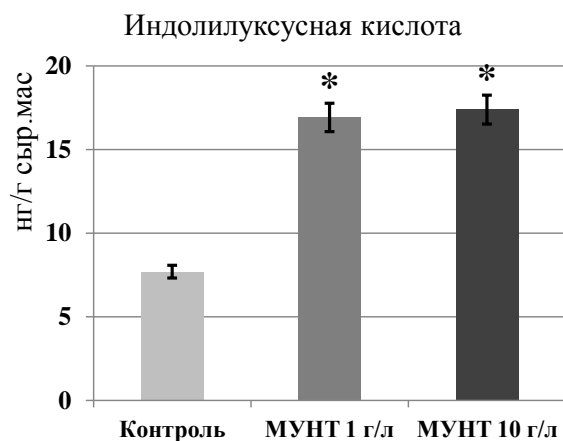


Рисунок 41 – Влияние МУНТ на концентрацию индолилуксусной кислоты в 10–дневных проростках *O. arenaria*.

В то же время было отмечено линейное снижение цитокининов под действием МУНТ (Рис. 42).

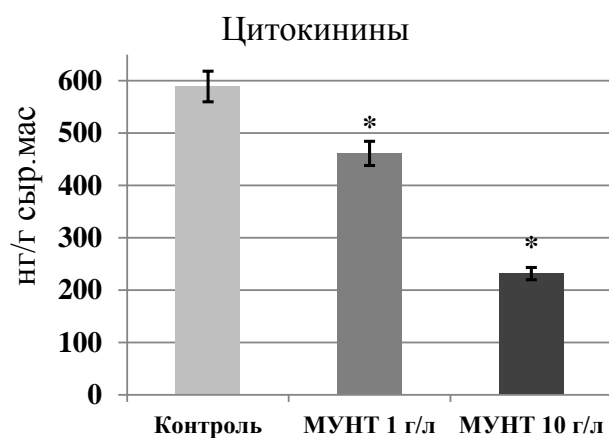


Рисунок 42 – Влияние МУНТ на концентрацию цитокининов в 10–дневных проростках *O. arenaria*.

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. 43).

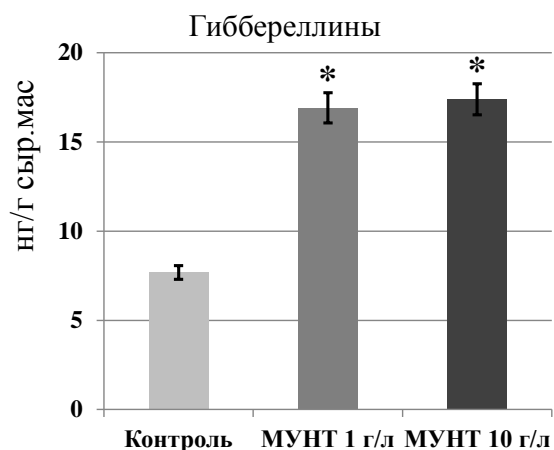


Рисунок 43 – Влияние МУНТ на концентрацию гиббереллинов в 10–дневных проростках *O. arenaria*.

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. 44).

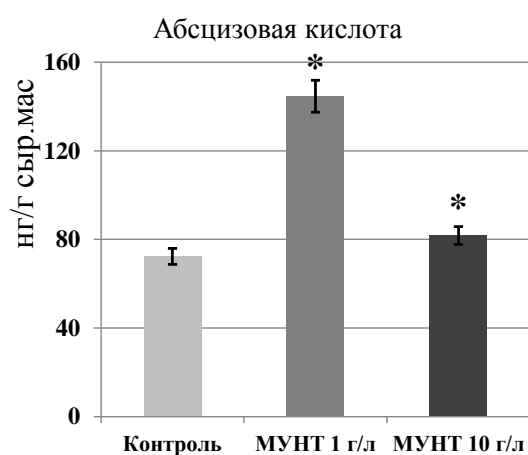


Рисунок 44 – Влияние МУНТ на концентрацию абсцизовой кислоты в 10–дневных проростках *O. arenaria*.

Известно, что растения отвечают на механические воздействия и повреждения путем изменения морфологии или скорости роста. Это явление получило название тигмоморфогенеза. Тигмоморфогенетические изменения

рассматриваются как процесс адаптации растений к стрессовым ситуациям, и важную роль в этом играют растительные гормоны (Chehab et al., 2009). При механическом стрессе повышается активность гормонов «стресса» растений и понижается активность гормонов роста, которые контролируют процессы морфогенеза и роста растений. Отмеченный нами рост концентрации «стрессового» гормона растений – абсцизовой кислоты свидетельствует об угнетающем действии НМ. Усиление активности ферментов антиоксидантной системы может привести к деактивации гормонов роста (Ostin et al., 1998; Woodward, Bartel, 2005). Ферменты антиоксидантной системы принимают участие в целом ряде биологических процессов, таких как фотосинтез, дыхание, белковый обмен. Данные ферменты обладают повышенной чувствительностью к внешним воздействиям, что позволяет использовать их активность в качестве тестовой характеристики для определения состояния растения. В большинстве случаев повышение активности ферментов антиоксидантной системы свидетельствует о включении механизма неспецифического ответа растения на стресс (Андреева, 1988). Можно предположить, что отмеченные колебания активности ферментов связаны с окислительным стрессом, вызванным УНМ. В связи с тем, что взаимодействие МУНТ с корнями растений сопровождается нарушением целостности покровных тканей и изменением активности антиоксидантных ферментов, такое взаимодействие можно рассматривать как механическое повреждение. Также возможна взаимная инактивация нанотрубок и молекул ферментов, т. н. биодegradация УНТ (Kagan et al., 2010) за счет сорбционных или других химических взаимодействий. Это может служить объяснением понижения активности антиоксидантных ферментов, отмеченное в ряде вариантов.

Еще одним механизмом воздействия МУНТ на клетки растений может являться изменение восприимчивости рецепторов фитогормонов, описанное для других типов НЧ (Binder et al., 2007; Strader et al., 2009). Образование под действием УНТ дополнительных водных каналов в оболочке семян, вероятно,

является одной из причин отмеченных стимулирующих эффектов (Khodakovskaya 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.

7 АНАЛИЗ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШАХ

Лабораторные мыши традиционно являются модельным объектом, используемым в экотоксикологии, фармакологии и экспериментальной медицине. 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.

7.1 Влияние многостенных углеродных нанотрубок на лабораторных мышей в остром эксперименте

По результатам исследования влияния МУНТ как нового экологического фактора установлено, что ни в одной из экспериментальных групп животных при однократном введении в дозировке 5000 мг/кг летального действия НМ не зафиксировано. Следует отметить, что испытанная доза МУНТ 5000 мг/кг значительно превышает возможную суточную дозу для человека или животных. Данная доза оказалась максимально возможной (по техническим причинам), которую можно было ввести в организм выбранного вида лабораторных животных. В связи с этим не удалось установить показатели средних смертельных доз (ЛД₅₀) МУНТ для мышей при его однократном пероральном введении.

Значения показателей интенсивности и характера двигательной активности, реакций на звуковой и болевой раздражители, состояния кожного и волосяного покрова, потребления воды и корма в остром эксперименте оставались в пределах соответствующих показателей контрольной группы и группы «Сажа» (Табл. 15).

Таблица 15 – Оценка общего состояния самцов лабораторной мыши в остром эксперименте

| Показатель | Контроль | Сажа | МУНТ |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Интенсивность и характер двигательной активности | Норма | Норма | Норма |
| Реакция на звуковой раздражитель | Положительная | Положительная | Положительная |
| Реакция на болевой раздражитель | Норма | Норма | Норма |
| Состояние кожного покрова | Норма | Норма | Норма |
| Состояние волосяного покрова | Гладкая, блестящая | Гладкая, блестящая | Гладкая, блестящая |
| Пищевое поведение | Норма | Норма | Норма |
| Питьевое поведение | Норма | Норма | Норма |

По окончании контрольного периода, согласно схеме эксперимента, животные были подвергнуты эвтаназии и вскрыты.

Расчет относительной массы висцеральных органов, в т.ч. сердца (Рис. 45), печени (Рис. 46), почек (Рис. 47) и селезенки (Рис. 48), достоверных отклонений от значений контрольной группы не зафиксировал.

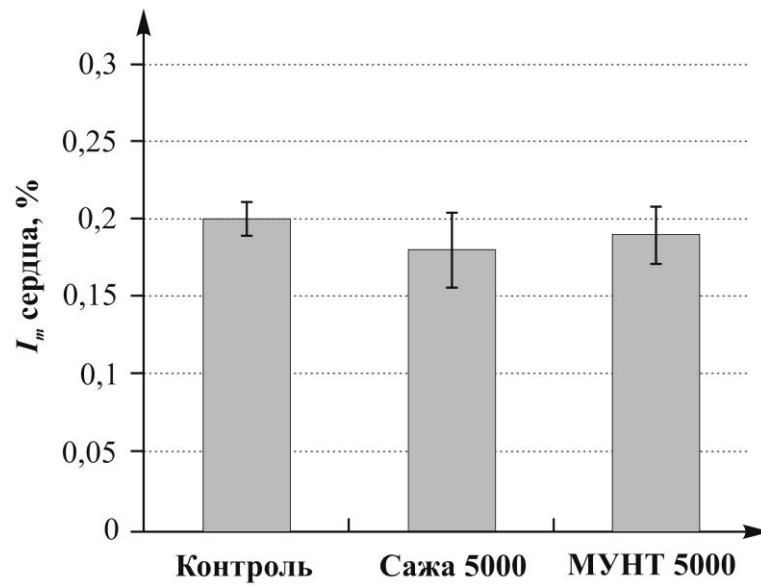


Рисунок 45 – Относительная масса сердца животных контрольной и экспериментальных групп.

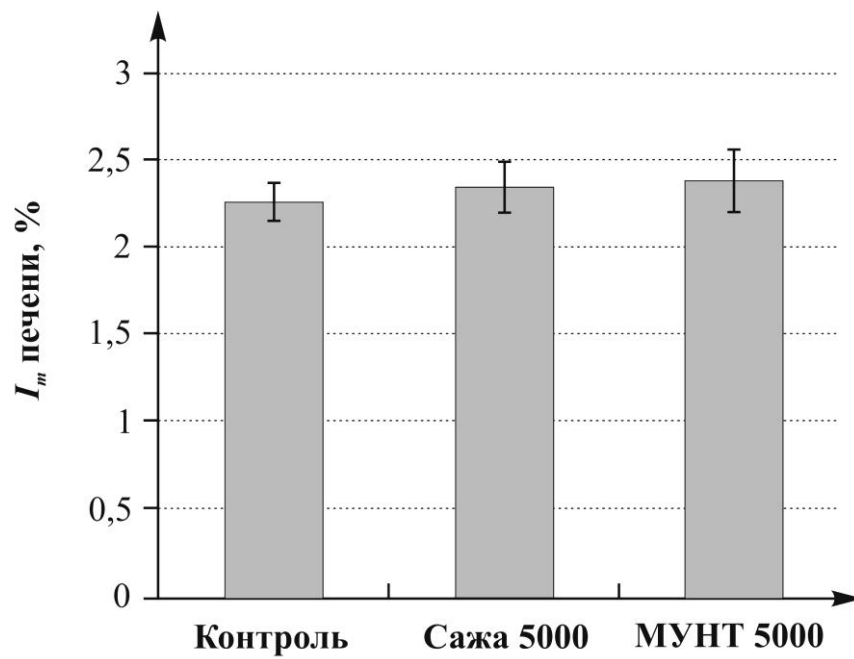


Рисунок 46 – Относительная масса печени животных контрольной и экспериментальных групп.

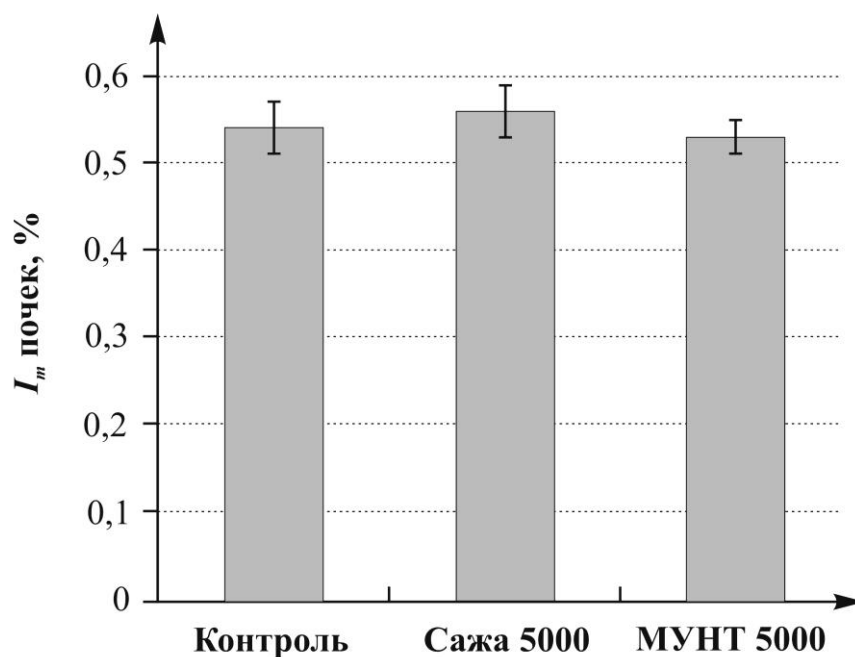


Рисунок 47 – Относительная масса почек животных контрольной и экспериментальных групп.

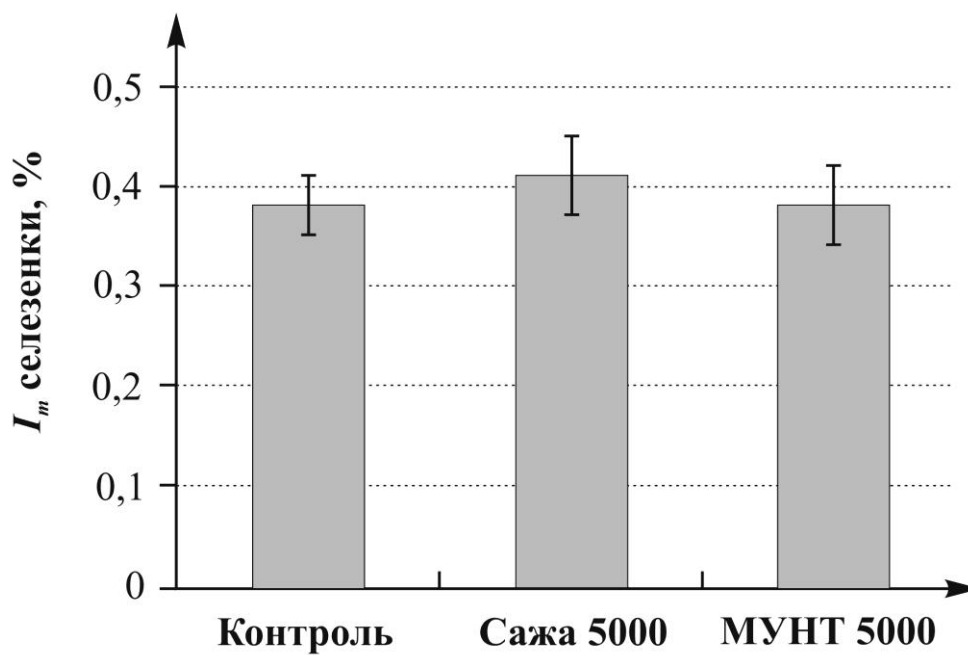


Рисунок 48 – Относительная масса селезенки животных контрольной и экспериментальных групп.

Гистологические исследования висцеральных органов, в т.ч. печени, почек, селезенки, легкого и семенников никаких патологических изменений не выявили.

7.2 Воздействие многостенных углеродных нанотрубок на лабораторных мышей в подостром эксперименте

В ходе подострого эксперимента, направленного на изучение влияния МУНТ в дозах 0,3, 3 и 30 мг/кг на самцов лабораторных мышей не было отмечено случаев гибели животных ни в одной из групп. Отклонений в общем состоянии животных ни в одной из групп также не отмечено. Исключение составили экспериментальные особи, получавшие МУНТ в дозе 30 мг/кг, у которых наблюдались незначительные нарушения двигательной активности, однако отклонений в координации и тонусе скелетных мышц выявлено не было (Табл. 16).

Таблица 16 – Оценка общего состояния самцов лабораторной мыши в подостром эксперименте

| Показатель | Контроль | Сажа | МУНТ 0,3 мг/кг | МУНТ 3 мг/кг | МУНТ 30 мг/кг |
|--|---------------|---------------|-------------------|-----------------|--------------------------|
| Интенсивность и характер двигательной активности | Норма | Норма | Норма | Норма | Незначительное угнетение |
| Реакция на звуковой раздражитель | Положительная | Положительная | Положительная | Положительная | Положительная |
| Реакция на болевой | Норма | Норма | Норма | Норма | Норма |

| | | | | | |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| раздражитель | | | | | |
| Состояние кожного покрова | Норма | Норма | Норма | Норма | Норма |
| Состояние волосяного покрова | Гладкая, блестящая | Гладкая, блестящая | Гладкая, блестящая | Гладкая, блестящая | Гладкая, блестящая |
| Пищевое поведение | Норма | Норма | Норма | Норма | Норма |
| Питьевое поведение | Норма | Норма | Норма | Норма | Норма |

На протяжении срока экспозиции животных исследуемым УНМ производился еженедельный контроль за динамикой набора массы тела. На последний день эксперимента минимальные значения набора массы тела животных зафиксированы в группе «МУНТ 3 мг/кг» и группе, получавшей сажу; максимальные значения – в группе «МУНТ 30 мг/кг». В группе, экспонированной МУНТ в дозе 0,3 мг/кг, значения статистически значимо от контроля не отличались (Рис.49).

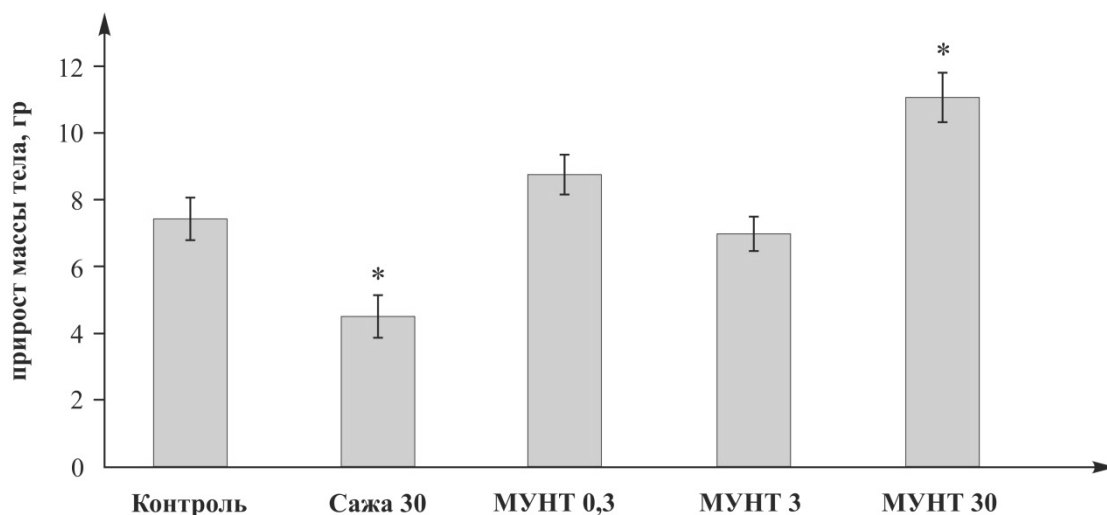


Рисунок 49 – Абсолютные значения среднегруппового прироста массы тела самцов мышей за время экспозиции.* - Различие достоверно (при $p < 0,05$) в сравнении со значениями контрольной группы.

По окончании срока экспозиции из каждой группы для вскрытия с целью детекции МУНТ в тканях висцеральных органов и проведения гистологических исследований было отобрано по 7 животных.

Поиск мест локализации НМ в тканях сердца, легких, пищевода, желудка, кишечника, печени, почек, тимуса, селезенки, семенников с помощью ПЭМ не дал результатов, что может свидетельствовать о биодеградации УНТ под действием каталитически активных пероксидаз (Kagan et al., 2010).

При микроскопическом исследовании внутренних органов мышей экспериментальных групп, наиболее заметные изменения обнаружены в тканях печени, лёгких и почек животных из группы МУНТ 30 мг/кг.

Указанные органы животных контрольной группы имели обычные гистологические характеристики (Рис. 50 А, Б, В).

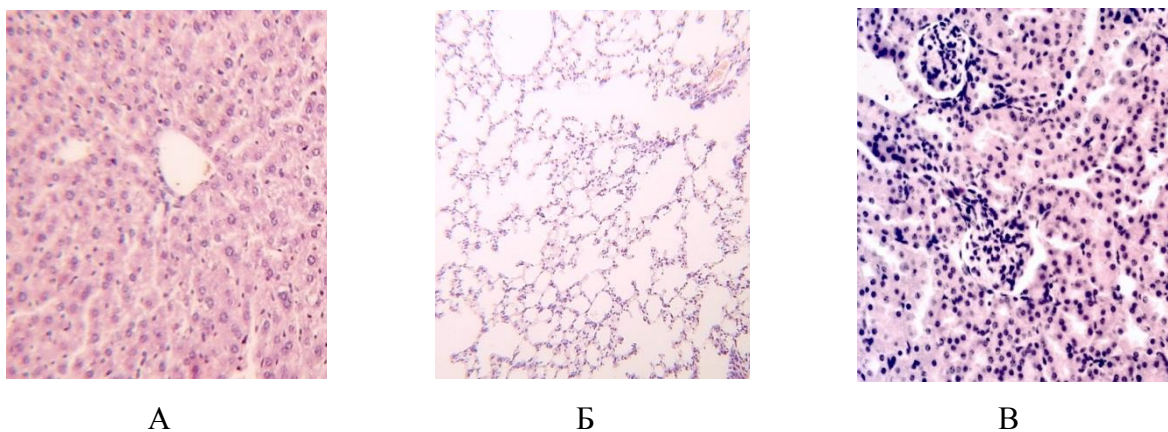


Рисунок 50 – Гистологические препараты печени (А), легких (Б) и почки (В) мыши контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином; а – ув. х400, б – ув. х200, в – ув. х400

В печени мышей, получавших МУНТ в дозировке 30 мг/кг, отмечено умеренное расширение сосудов венозного русла с ярко выраженным их полнокровием (Рис. 51 А). Только часть кровеносных сосудов была без содержимого. В органе определялись два вида лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов: мелко- и среднеочаговые внутридольковые, а в портальных трактах более крупные – периваскулярные (Рис. 51 Б).

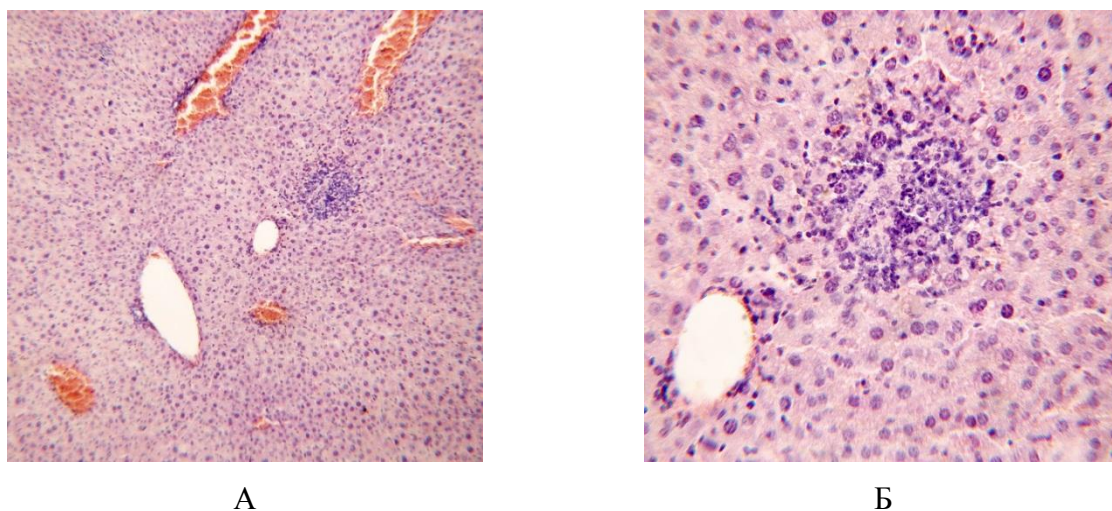
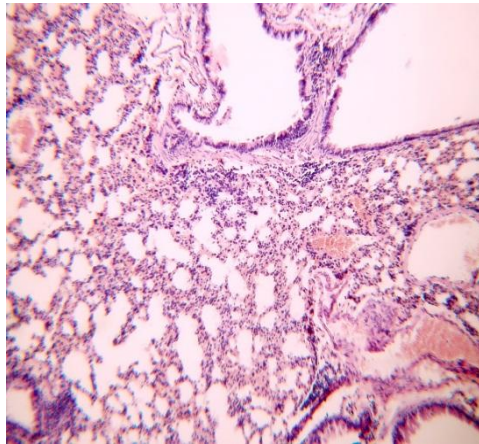


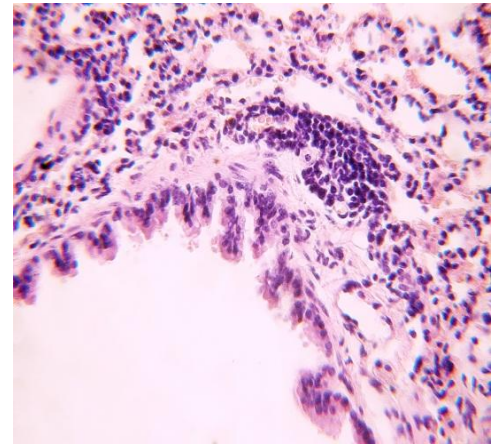
Рисунок 51 – Гистологические препараты печени мыши экспериментальной группы «МУНТ 30 мг/кг». Окраска гематоксилином и эозином; А – ув. х100, Б – ув. х400

В печени этой группы животных слабее была выражена дольчатость. Балочный тип строения во многих долях заметно нарушался. В гепатоцитах развивались дистрофические процессы с появлением зёрен и вакуолей в цитоплазме клеток. Наблюдался умеренный полиморфизм гепатоцитов, как по размерам, так и по степени окрашивания хроматина (Рис. 51 Б). Активизация клеток Купфера (звёздчатые макрофаги печени) в стенке внутридольковых синусоидных капилляров была более заметна по периферии крупных инфильтратов порталных трактов (Рис. 51 Б).

В лёгких животных экспериментальной группы, получавшей МУНТ в дозе 30 мг/кг, отмечалось резкое снижение воздушности паренхимы с присутствием небольших ателектазов, а также умеренное расширение и полнокровие в основном венозных сосудов (Рис. 52 А). Некоторые сосуды микроциркуляторного русла с явлениями стаза эритроцитов. В органе определялись периваскулярные и перибронхиальные лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты преимущественно мелких и средних размеров (Рис. 52 Б). В лёгких выявлено разрастание интерстициальной соединительной ткани с наличием в некоторых её участках умеренной диффузной лимфоцитарной инфильтрации. В просвете части альвеол респираторного отдела находились эритроциты: единичные и скоплениями (Рис. 52 Б). Определялись и незначительные единичные кровоизлияния в паренхиму. Отмечено повышенное содержание в органе макрофагов как в межальвеолярных перегородках, так и в просвете альвеол ходов и мешочков.



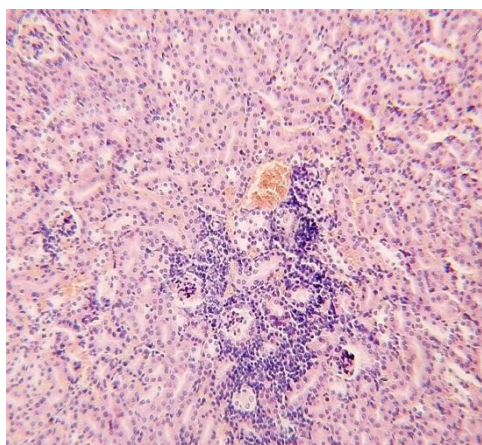
А



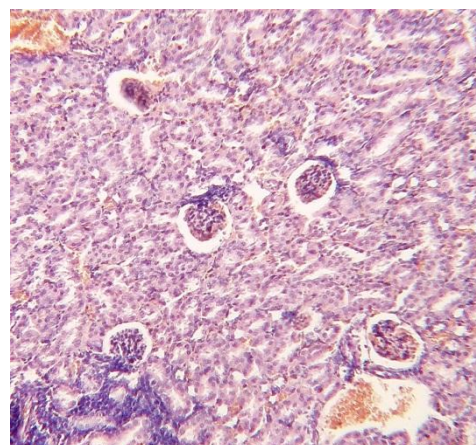
Б

Рисунок 52 – Гистологические препараты лёгких мыши экспериментальной группы «МУНТ 30 мг/кг». Окраска гематоксилином и эозином; А – ув. x100, Б – ув. x400

Достаточно выраженные изменения морфологической структуры определялись в почках мышей экспериментальной группы. Обнаружены очень крупные по размерам периваскулярные и межканальцевые лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты (Рис. 53 А, 53 Б). Было выявлено достаточное количество мелких инфильтратов между канальцами и вокруг почечных телец. Встречалась также диффузная инфильтрация паренхимы почек клетками лимфоидного ряда и макрофагами. Как и в предыдущих органах, многие сосуды венозного русла, особенно коркового вещества, умеренно расширены и заполнены эритроцитарной массой (Рис. 53 Б).



А



Б

Рисунок 53 – Гистологические препараты почки мыши экспериментальной группы «МУНТ 30 мг/кг». Окраска гематоксилином и эозином; а – ув. x100, б – ув. x200

Определённое число почечных телец уменьшено в размерах с деформацией в них сосудистых клубочков (Рис. 53 А). В значительной части этих клубочков отмечена гипертрофия мезангиальных клеток, выполняющих фагоцитарную функцию (Рис. 53 Б). Большое количество почечных телец имеют расширенные просветы капсулы Шумлянско-Боумена (Рис. 53 Б). В некоторых тельцах эпителиальные клетки наружного листка капсулы приобретали кубическую форму. В целом структура большинства канальцев почечных нефронов не изменена. Только в некоторых участках коркового вещества органа часть дистальных канальцев была умеренно расширена.

Таким образом, в ходе гистологических исследований 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. 54). Это согласуется с результатами ряда исследований (Саяпина и др., 2014; Donaldson, 2012), в которых были продемонстрированы разнообразные гистопатологии висцеральных органов мышей, развивающиеся под действием УНТ.

Наблюдаемые нами эффекты носили дозозависимый характер (Рис. 54). В максимальной дозировке патологические изменения проявлялись на макроскопическом уровне – у животных группы «МУНТ 30 мг/кг» была обнаружена гипотрофия печени (на 15%). При этом стоит отметить, что в группе мышей, получавших сажу в той же дозировке, подобных нарушений не зафиксировано.

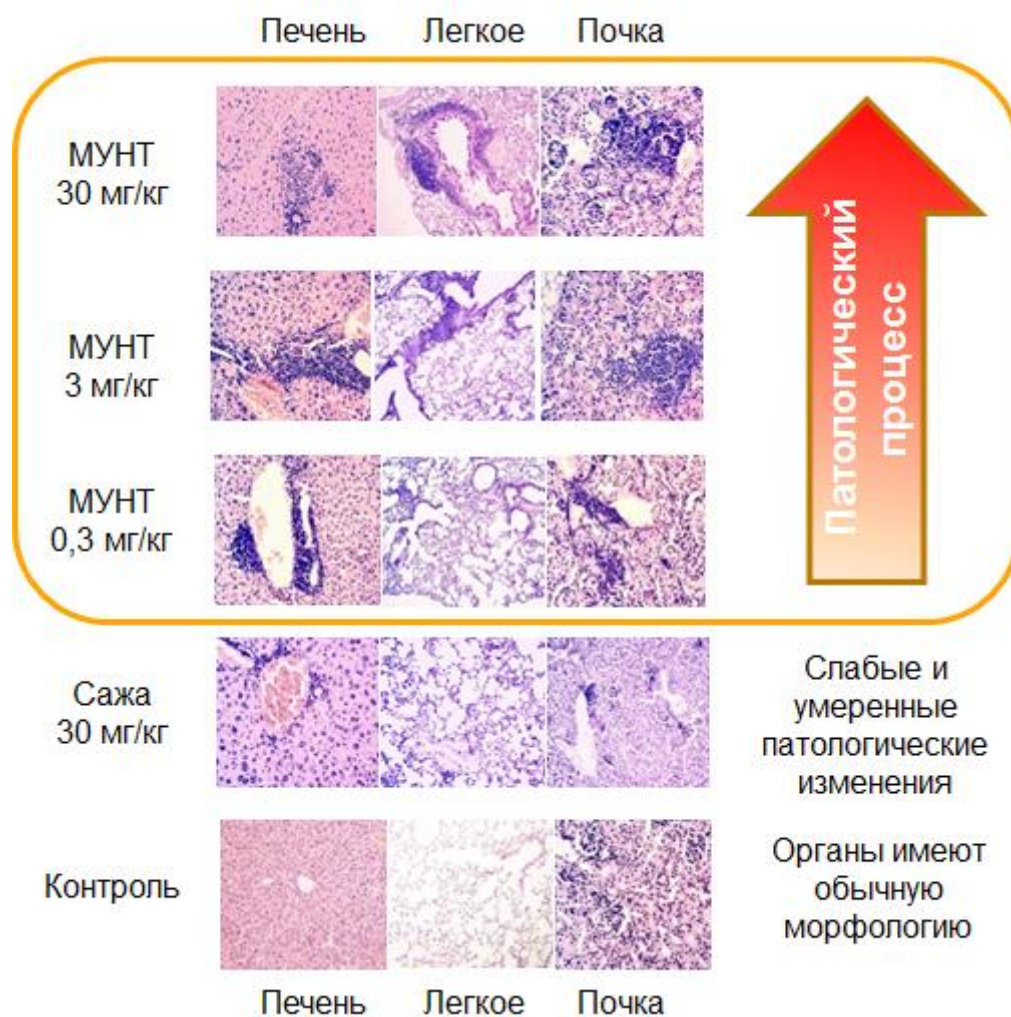


Рисунок 54 – Гистологические изменения в тканях органов животных в подостром эксперименте. Окраска гематоксилином и эозином; ув. x100 - x400

МУНТ оказывали негативное воздействие на структуру изученных органов, приводя к заметным сосудистым нарушениям и появлению в паренхиме органов лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов, как результат активной пролиферации клеток в первичных и вторичных лимфоидных

органах. При этом у животных, гистопатологически обследованных после проведения исследований репродуктивной токсичности (1 мес. после окончания экспозиции), воспалительные процессы обнаружены только в тканях печени, что может свидетельствовать о возможности восстановления тканей после прекращения экспозиции МУНТ. Полученные данные согласуются с результатами многочисленных исследований, подтверждающих токсичность МУНТ по отношению к клеткам и тканям висцеральных органов млекопитающих (Du et al., 2013; Lam et al., 2006; Jackson et al., 2013; Reddy et al., 2010; Luyts et al., 2014; Zhao, Liu, 2012; Donaldson et al., 2013).

Для оценки выраженности гонадотропного действия был проведен цитогистологический анализ семенников с расчетом индекса сперматогенеза, который не выявил отклонений у животных экспериментальных групп (Табл.17).

Таблица 17 – Значения индекса сперматогенеза контрольной и экспериментальных групп в последний день экспозиции

| Показатель | Контроль | Сажа | МУНТ 0,3 мг/кг | МУНТ 3 мг/кг | МУНТ 30 мг/кг |
|--|----------|----------|-------------------|-----------------|------------------|
| Индекс сперматогенеза, отн. ед. ($M \pm m$) | 3,53±0,2 | 3,49±0,3 | 3,48±0,2 | 3,48±0,4 | 3,45±0,3 |

M – среднее значение в группе, m – среднеквадратическое отклонение.

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. 55).

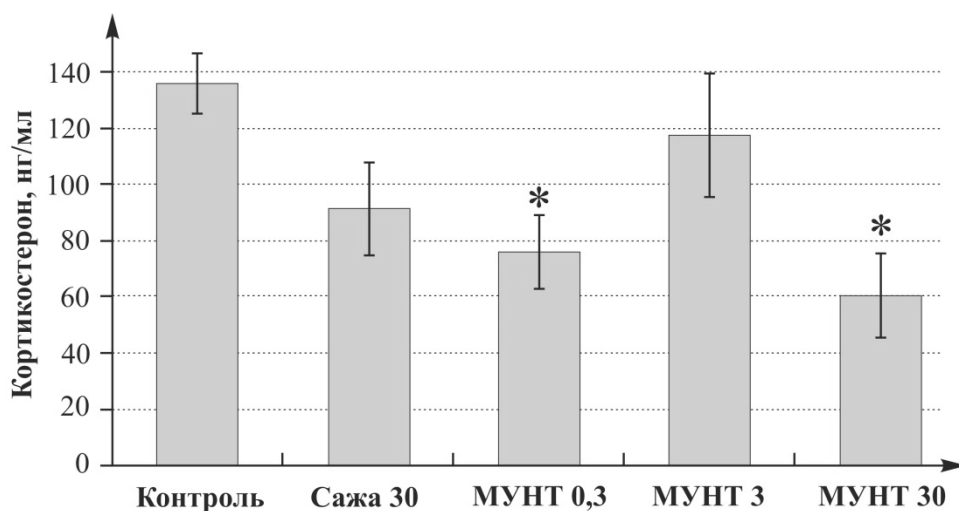


Рисунок 55 – Кортикостерон в плазме крови самцов мышей, нг/мл. * - Различие достоверно (при $p < 0,01$) в сравнении со значениями контрольной группы.

Данный факт обусловлен как постепенным истощением стресс-реализующей системы организма под действием МУНТ, так и изменением метаболизма стероидов.

Хотя достоверных отличий в содержании тестостерона в эксперименте зафиксировано не было, можно отметить дозозависимый эффект, заключающийся в тенденции к снижению уровня свободного тестостерона в плазме крови мышей, экспонированных МУНТ (рис. 56). В группе «МУНТ 30 мг/кг» он был существенно ниже контрольных значений ($2,09 \pm 0,39$ пг/мл и $15,43 \pm 4,93$ пг/мл соответственно). В группе «Сажа» исследуемый показатель превышал контрольные значения ($27,52 \pm 3,76$ пг/мл и $15,43 \pm 4,93$ пг/мл соответственно). Данные результаты свидетельствуют о зависимости физиологического эффекта НМ от его структуры (аллотропной модификации). В группах «МУНТ 0,3 мг/кг» и «МУНТ 3 мг/кг» отличий от контроля не выявлено.

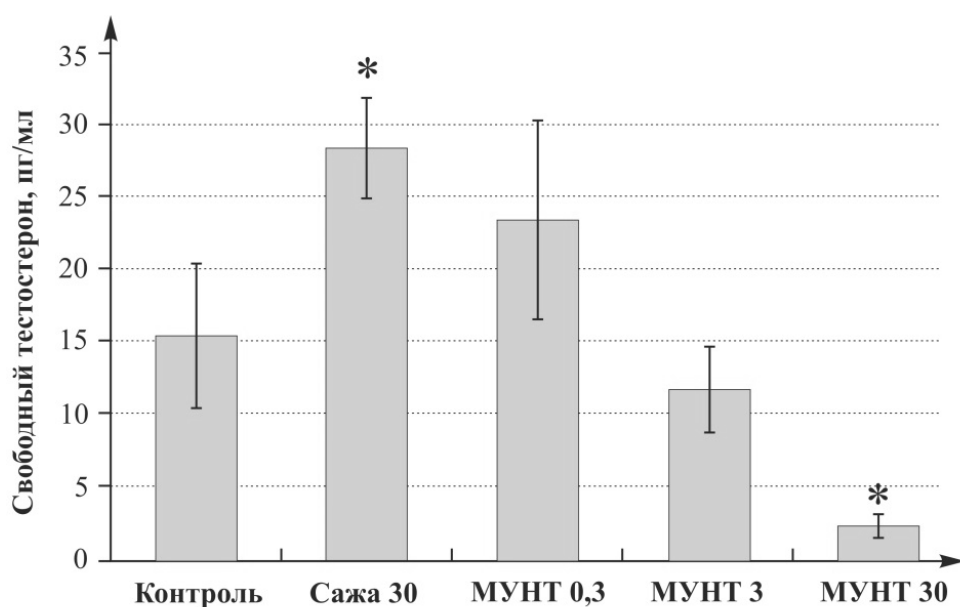


Рисунок 56 – Показатели уровня свободного тестостерона в плазме крови самцов мышей.* – Различие достоверно (при $p < 0,05$) в сравнении со значениями контрольной группы.

Важной проблемой экологической оценки МУНТ является определение их репродуктивных эффектов. Несмотря на то, что токсичность МУНТ по отношению к самцам, самкам и эмбрионам мышей ранее изучалась (Bai et al., 2010; Hougaard et al., 2010; Lim et al., 2011; Pietroiusti et al., 2011; Ivani et al., 2012; Fujitani et al., 2012; Hougaard et al., 2013; Qi et al., 2014), однозначных выводов о наличии или отсутствии репродуктивной токсичности сделано не было. Поэтому нами было проанализировано количество и качество потомства самцов каждой из групп, а также произведен расчет их оплодотворяющей способности.

После вскрытия рогов матки каждой из самок, подвергавшихся подсадке, определяли количество живых и мертвых эмбрионов, при этом статистически значимых отличий между контрольной и экспериментальной группами не зафиксировано (Рис. 57).

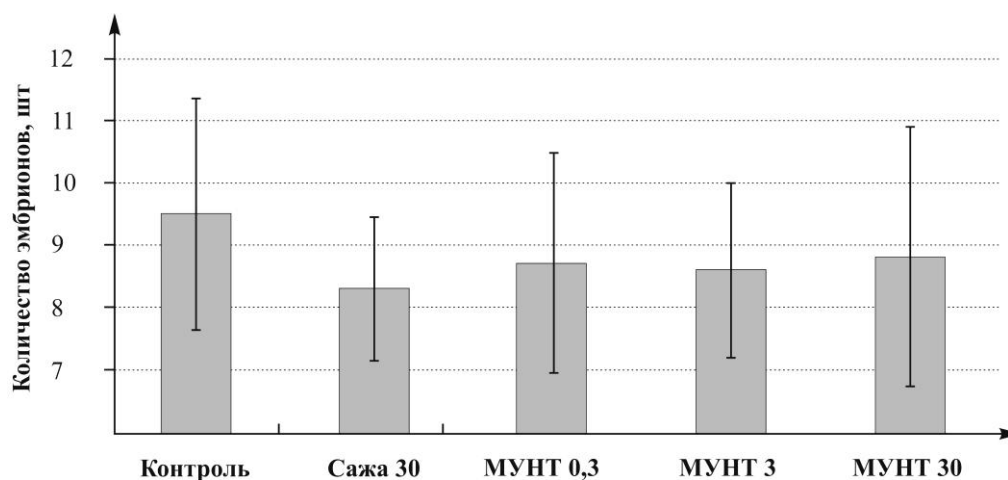


Рисунок 57 – Среднегрупповые значения количества потомства в помете.

Доля живых эмбрионов в контрольной и экспериментальных группах также достоверно не отличалась (Рис. 58).

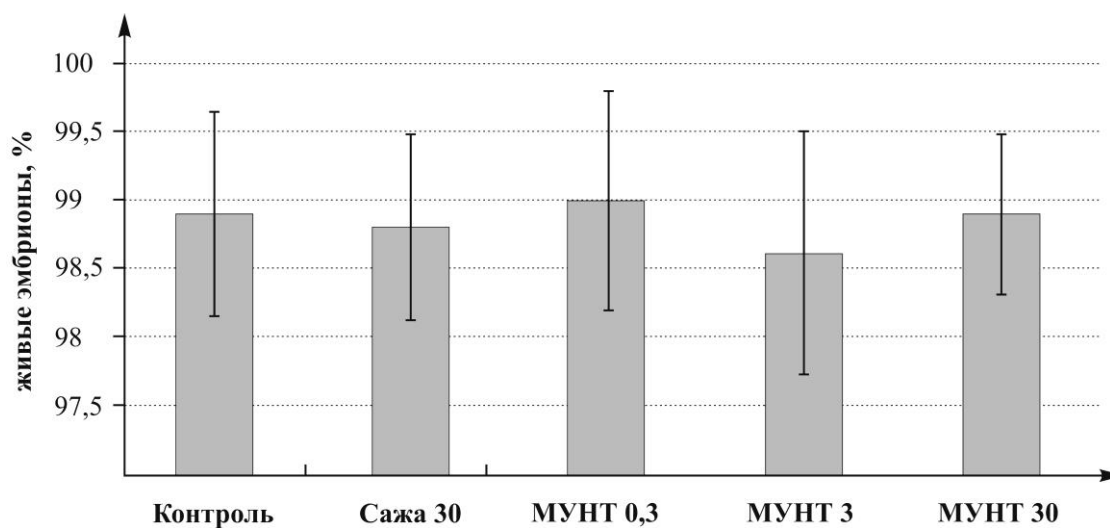


Рисунок 58 – Среднегрупповые значения доли живых эмбрионов в помете.

Показатели массы эмбрионов во всех группах находились в пределах нормы (Рис. 59, 60).

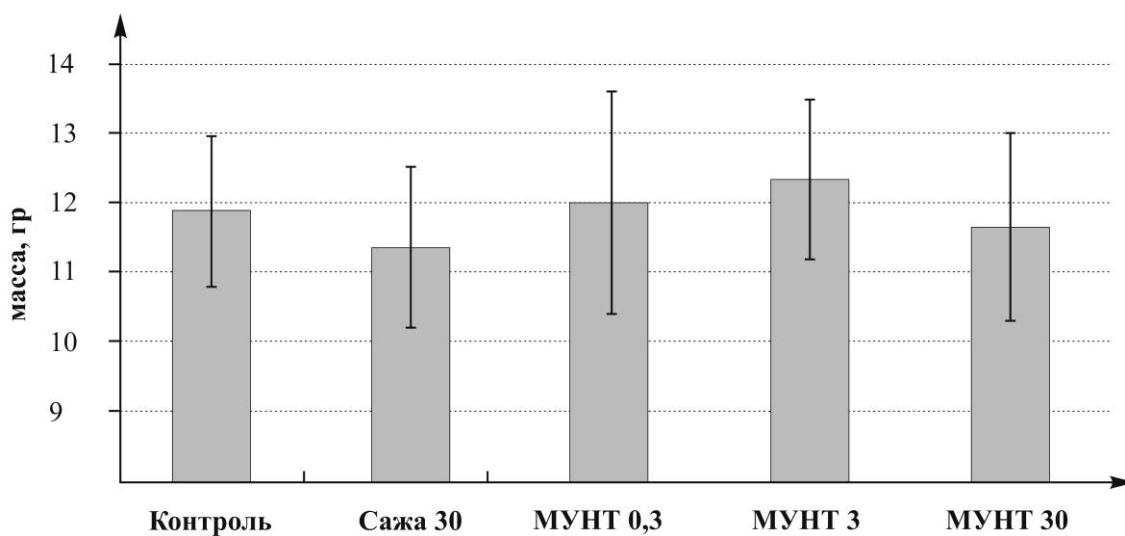


Рисунок 59 – Среднегрупповые значения массы помета одной самки.

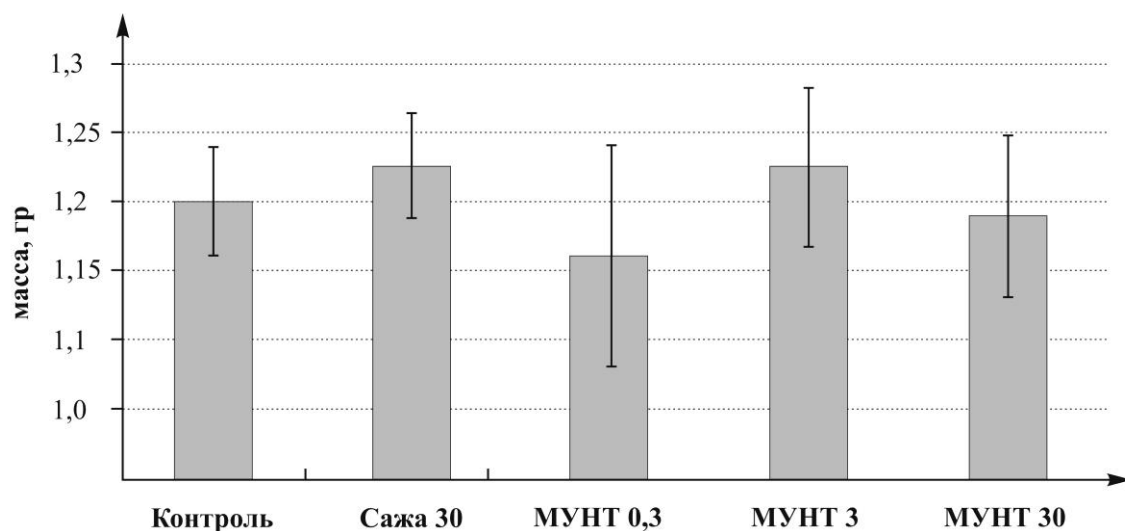


Рисунок 60 – Среднегрупповые значения массы отдельного эмбриона.

Видимых аномалий при осмотре живых эмбрионов не выявлено.

Расчет индекса оплодотворяющей способности I позволил выявить дозозависимый угнетающий эффект во всех экспериментальных группах (Рис. 61).

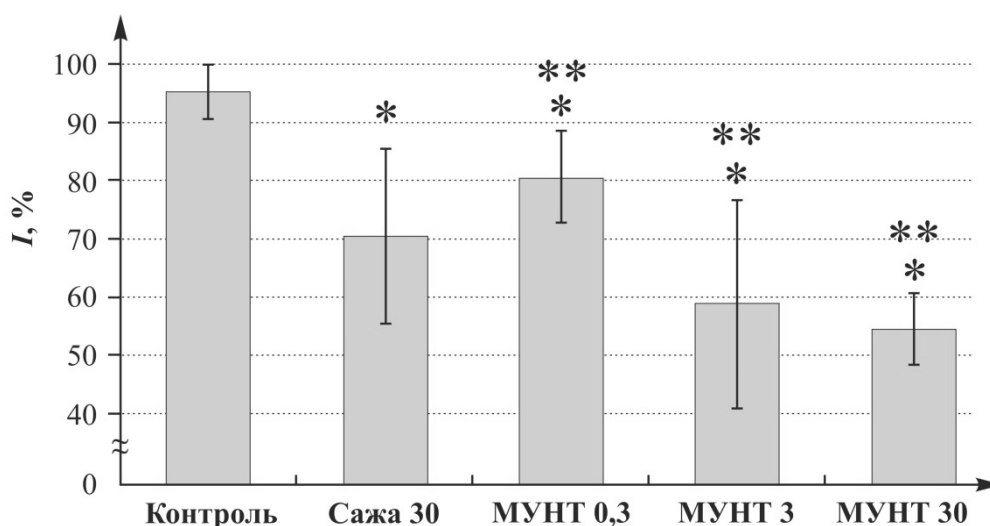


Рисунок 61– Среднегрупповые значения индекса оплодотворяющей способности самцов мышей. * – Различие достоверно (при $p < 0,01$) в сравнении с значениями контрольной группы; ** – различие достоверно (при $p < 0,01$) в сравнении со значениями групп МУНТ.

Хотя, как упоминалось выше, ранее проводились исследования воздействия УНТ различных типов на самок и самцов мышей и крыс (Lim et al., 2011; Hougaard et al., 2013; Hougaard et al., 2010; Ivani et al., 2012; Qi et al., 2014; Fujitani et al., 2012; Bai et al., 2010), репродуктивная токсичность МУНТ, проявляющаяся в снижении плодовитости самцов, отмечена впервые.

Следует также отметить, что в группе «Сажа» исследуемый показатель снизился в значительно меньшей степени, чем в группе «МУНТ» в той же дозировке, что свидетельствует о более высокой физиологической активности МУНТ (Табл. 18).

Таблица 18 – Индекс оплодотворяющей способности самцов мышей

| Показатель | Контроль | Сажа | МУНТ 0,3 мг/кг | МУНТ 3 мг/кг | МУНТ 30 мг/кг |
|-------------------|-----------|------------|-------------------|-----------------|------------------|
| $I, \% (M \pm m)$ | 95,2±6,07 | 70,2±15,97 | 79,8±7,53 | 59,5±13,68 | 54,8±6,07 |

M – среднее значение в группе, m – среднеквадратическое отклонение.

Таким образом, подтверждены имеющиеся данные о том, что печень, почки и лёгкие являются одними из органов-мишеней для НЧ (Chen et al., 2007; Serrano et al., 2015). Возможно два пути патологического воздействия МУНТ на организм тест-объектов.

Первый вариант предполагает непосредственное проникновение МУНТ из пищеварительного тракта через кишечные ворсинки в кровеносную систему. Из нее НЧ поступают непосредственно в органы-мишени. Хроническая инфильтрация паренхимы МУНТ в этих органах приводит к наблюдаемым патологическим изменениям, имеющим сходство с отмеченными в работе (Kolosnjaj-Tabi et al., 2010). Однако, отсутствие подтверждения наличия МУНТ в тканях печени, почек и легких животных экспериментальных групп в ходе электронномикроскопического исследования не позволяет настаивать на справедливости этой теории.

Вторая версия заключается в опосредованном действии МУНТ посредством механического раздражения стенок кишечника и развития воспаления его слизистой оболочки, сопровождающегося поступлением в кровь медиаторов воспаления. Поскольку организм не способен элиминировать раздражающий агент, развивается хронический воспалительный процесс, сопровождающийся системным действием медиаторов воспаления и приводящий к общей интоксикации. Многие маркеры воспаления и окислительного стресса цитотоксичны по отношению к клеткам собственного организма. Это согласуется с представлениями об индуцировании НЧ окислительного стресса, который обуславливается активными формами кислорода, способными провоцировать воспалительные, генотоксические и цитотоксические последствия (Sharma et al., 2007; Murray et al., 2008). Таким образом, согласно данной теории, МУНТ воздействуют локально на слизистую кишечника, вызывая при этом наблюдаемые патологические изменения в отдаленных органах. Отмеченные колебания уровня кортикостарона, являющегося стрессорным гормоном, могут являться подтверждением подобного сценария.

Наблюдаемое снижение уровня тестостерона и значения индекса оплодотворяющей способности самцов свидетельствуют о наличии репродуктивной токсичности МУНТ, что является важным для понимания экотоксикологических параметров данного НМ результатом. На примере лабораторных мышей показано, что исследуемый УНМ представляет опасность при попадании в желудочно-кишечный тракт млекопитающих, что требует соблюдения мер предосторожности при контакте с ним, особенно в условиях промышленного производства. Значительные нарушения, обнаруженные при гистологическом исследовании экспонированных особей, а также в ходе исследования показателей гормональной системы и репродуктивной токсичности свидетельствуют о выраженном негативном воздействии МУНТ. Поэтому уровень потенциальной опасности НМ следует оценивать как «высокий», что согласуется с результатами осуществленного нами моделирования (раздел 4).

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

8 РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОБОСНОВАННЫХ НОРМ ВОЗДЕЙСТВИЯ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БИООБЪЕКТЫ

Примененный в работе алгоритм оценки позволил определить степень экологической опасности исследуемого материала, а также выявить связанные с особенностями структуры молекул и молекулярных комплексов при одинаковом химическом составе различия в экотоксическом воздействии УНМ на примере МУНТ и сажи.

Учитывая значительное структурное разнообразие НМ и связанные с этим изменения свойств, необходимо обратить внимание на важность первичного исследования НЧ. Для этого целесообразным представляется описанное в разделе 3 применение методов ПЭМ и СЭМ, а также рентгенофлуоресцентного анализа, позволяющих получить объективные и максимально полные сведения о микро- мезо- и макроструктуре и химическом составе образцов.

В рамках работы был предложен и успешно апробирован комплекс методов изучения содержания в средах и моделирования процесса перехода МУНТ в водную суспензию для экологических исследований (раздел 3). В ходе инструментального анализа содержания НЧ в воздушной среде для оценки наличия угрозы экспозиции биообъектов аэрозольными частицами установлена эффективность спектрометрического метода с помощью спектрометра-классификатора частиц с высокой мобильностью. Продемонстрирована применимость метода ультразвуковой обработки для перевода НЧ в форму водных суспензий. Высокий уровень дисперсности и стабильности полученных коллоидных систем были подтверждены методом динамического светорассеяния.

Концептуальное моделирование степени потенциальной опасности, описанное в разделе 4, показавшее высокий уровень экологического риска со стороны МУНТ, получило подтверждение валидности в ходе комплексного

биотестирования УНМ. Это открывает возможности для оптимизации системы оценки безопасности НМ за счет сокращения трудозатрат при проведении первичных экологических исследований материалов на основе МУНТ.

В ходе оценки влияния МУНТ на бактерии и гидробионты (раздел 5) был выделен ряд тест-объектов и тест-функций, с помощью которых целесообразно проводить экспресс-оценку экологической безопасности УНМ, а также разрабатывать соответствующие экологические нормативы. Так, тест на выживаемость бактерий *E. coli* и *B. cereus* применим с учетом наблюдавшихся эффектов «малых доз», что усложняет экологическое нормирование. В то же время аналогичные тесты с использованием объектов «Эколюм» (*E. coli* М-17), *C. affinis* и *Sc. quadricauda* могут использоваться без ограничений. Будучи весьма устойчивым к воздействию МУНТ на организменном уровне, личинки *Ch. riparius* проявили достаточно высокую чувствительность в ходе цитогенетических исследований, что дает возможность говорить об эффективности анализа активности ядрышкового организатора политенных хромосом клеток слюнных желез *Ch. riparius* в качестве метода экологической оценки УНМ.

Описанные в разделе 6 результаты применения методов исследования процессов бионакопления и влияния НЧ на высшие растения (на примере *O. arenaria*) позволили выявить 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, что делает эти параметры перспективными для проведения экологической оценки УНМ. К этой же категории можно отнести методы исследования бионакопления МУНТ в растениях.

Наконец, используемые в разделе 7, посвященном анализу влияния МУНТ на млекопитающих (на примере *M. musculus*) методы также показали достаточную чувствительность и избирательность. Исследование

патофизиологических, биохимических, гистологических и репродуктивных показателей позволило подтвердить высокую опасность данных НЧ, связанную с негативным воздействием на мужскую репродукцию, а также выявить достоверные различия в эффектах, оказываемых УНМ различных типов.

Результаты работы по оценке применимости различных методов биоэкологических исследований при разработке нормативов в области безопасности материалов на основе МУНТ, а также проведении экологической оценки других наноразмерных продуктов неполного сгорания соединений углерода, таких как ОУНТ, ДУНТ, фуллерены, графены приведены на рисунке 62.

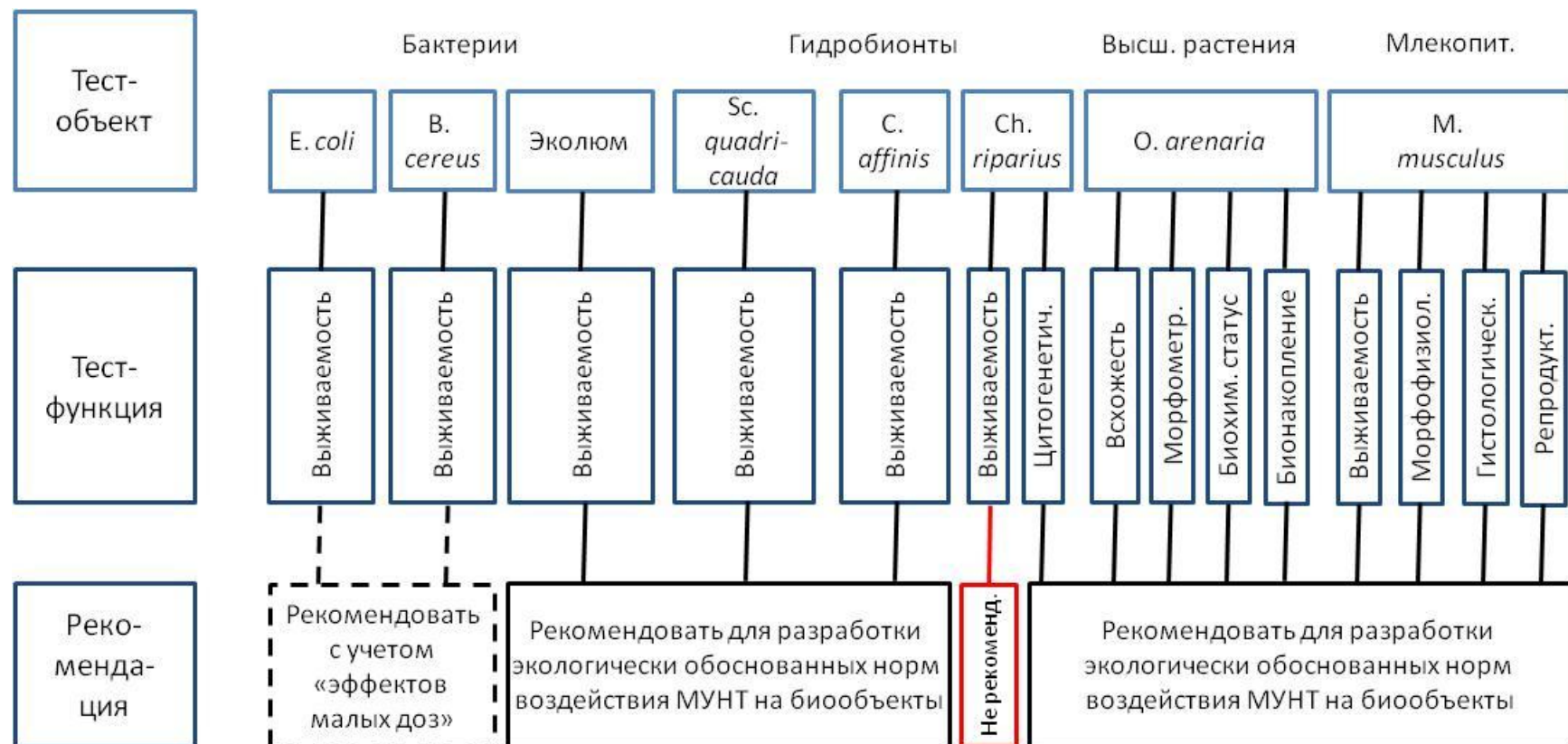


Рис. 62 – Анализ применимости тест-объектов и тест-функций для разработки экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты

Применение апробированных нами исследовательских алгоритмов, включая проведение идентификации, оценки содержания в средах и пробоподготовки, концептуальное моделирование опасности НМ, использование определенных в работе тест-объектов и тест-функций можно рекомендовать для первичного исследования экологической безопасности нанодисперсных продуктов неполного сгорания углеродосодержащих материалов. Установлена принадлежность МУНТ к умеренно-опасным веществам. Сформулированы предложения по нормам безопасного поступления МУНТ. В частности, показано, что безопасная для гидробионтов концентрация МУНТ не превышает 2 мг/л; для организма млекопитающих безопасной при ежедневном пероральном поступлении является дозировка не более 0,3 мг/кг. Таким образом, разработаны научно-методические основы оценки экологических эффектов МУНТ и других углеродных наноструктурных материалов.

Стоит отметить, что значительный накопленный объем нанотоксикологических данных указывает на необходимость пересмотра долгое время доминировавшей при проведении исследований в области экологической безопасности парадигмы, основанной на приоритете количественного анализа содержания химических элементов и соединений в природных и техногенных средах. Недооценка роли пространственной организации макромолекул и молекулярных комплексов при неизменном химическом составе (достаточно вспомнить о колоссальной значимости аналогичных структурных особенностей молекул белков и нуклеиновых кислот!), т.е. вклада наноструктуры поллютантов в проявление их экотоксических свойств значительно ограничивает применимость используемых подходов, включая нормирование антропогенного воздействия на окружающую среду. Это ставит перед современной экологической наукой новые задачи, решению которых призвана способствовать система оценки безопасности НЧ, разработка существенных элементов которой проведена в настоящей работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе решена значимая научно-методическая проблема, заключающаяся в теоретическом и экспериментальном обосновании методов экологического исследования углеродных НЧ на примере МУНТ для определения пределов толерантности и оценки устойчивости организмов к данному фактору природно-техногенного происхождения.

По результатам исследования можно сделать следующие 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 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-его 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.

Рекомендуется использование полученных в ходе исследования экспериментальных результатов и методических разработок в практической деятельности широкого круга исследователей и специалистов природоохранных и санитарных служб, а также при проведении экологического нормирования нанодисперсных загрязнений.

Перспективы дальнейших исследований в предметной области связаны, прежде всего, с выявлением механизмов токсичности НЧ для формирования научных основ безопасного развития нанотехнологий.

Список использованных источников

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Алексеева О. Воздействие наноматериалов на окружающую среду // Перспективные технологии.– 2008. – Т. 15. – № 13/14. – С. 6–9.
3. Алексеева О. Новая дисциплина – нанотоксикология // Перспективные технологии. – 2007. – Т. 14. – № 19. – С. 2–4.
4. Амплеева Л.Е., Полищук С.Д., Сушилина М.М., Селиванов В.Н. Влияние УДП меди, железа и кобальта на урожайность и накопление биологически активных веществ с/х культур // Международная конференция «Химическое образование и развитие общества», тезисы докладов. – Москва, 2000. – 36 с.
5. Аналитическое агентство Cleandex. Углеродные нанотрубки: виды и области применения [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.cleandex.ru/articles/2007/12/10/nanotubes-carbon>, дата обращения 12.07.2015
6. Бесплодие в супружестве. Под ред. Юнда И.Ф. – К.: Здоровья. – 1990. – 463 с.
7. Биология развития млекопитающих. Методы. Пер. с англ. Под ред. Манк М. – М.: Мир. – 1990. – 406 с.
8. Богданов А.А., Дайнингер Д., Дюжев Г.А. Перспективы развития промышленных методов производства фуллеренов // Журнал технической физики. – 2000. – Т. 70.– № 5. – С. 1–7.
9. Большаков А.М., Крутько В.Н., Пуцилло Е.В. Оценка и управление рисками влияния окружающей среды на здоровье человека. – М., 1999. – 254 с.
10. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. – 1951. – Т. 16, Вып. 4. –С. 352.

11. Буштуева К.А., Случанко И.С. Методы и критерии оценки состояния здоровья населения в связи с загрязнением окружающей среды. – М.: Медицина, 1979.- 160 с.
12. Важов В.М. Кормовые культуры. – Бийск, 1997. – 294 с.
13. Временные гигиенические нормативы от 15.03.2010 «Гигиенический контроль при работе с наноматериалами искусственного происхождения». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?base=EXP;frame=1;n=525625;req=do> с (дата обращения: 18.07.2015).
14. Гладкий М. Ф., Корнилов А. А., Яценко Я. Л. Эспарцет. – М.: Колос, 1971. – 126 с.
15. Глухов М.М. Альбом медоносов. Министерство сельского хозяйства РСФСР – 1960 – 172 с.
16. Гмошинский И.В., Смирнова В.В., Хотимченко С.А. Современное состояние проблемы оценки безопасности наноматериалов // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5. – № 9-10. – С. 6-10.
17. Годымчук А.Ю., Савельев Г.Г., Зыкова А.П. Экология наноматериалов: учебное пособие. - М., БИНОМ. - 2012. - 272 с.
18. Головин Ю.И. Введение в нанотехнику. - М.: Машиностроение. - 2007. - 496 с.
19. Головин Ю.И. Наномир без формул. Под ред. проф. Л.Н. Патрикеева. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. - 2011. - 543 с.
20. Горбачев А. А. Повышение всхожести семян перца и моркови за счет обработки их ультрадисперсными и сверхтонкими препаратами (УДП) металлов: дис. ... к. с.-х.н. – Москва, 2001. – 211 с.
21. ГОСТ 12038-84 – Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.
22. ГОСТ Р 50258-92 – Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия.

23. ГОСТ Р 53434-2009 – Принципы надлежащей лабораторной практики.
24. Гусев А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. Изд. 2-е, исправленное и дополненное. – Москва: Наука-Физматлит. - 2007. - 416 с.
25. Дёмин С.Ю. Изменчивость степени конденсированности политенных хромосом в клетках разных органов личинок *Chironomus plumosus* из природы: автореф. канд. дис...Л., 1989. – 25 с.
26. Дульский Г.Г. Эспарцет и смеси его с другими травами в Иссык-Кульской котловине. – Фрунзе, 1954 – 12 с.
27. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С. 43–44.
28. Еськов Е.К., Чурилов Г.И. Влияние обработки семян кукурузы ультрадисперсным порошком железа на развитие растений и аккумуляцию в них химических элементов // Агрэкология. – 2011. – №10. С. 74-77.
29. Жеглова Т.В., Воронцова С.В., Назарова А.А., Чурилов Г.И. Влияние железа в ультрадисперсном состоянии на химический состав растений и семян кукурузы. // Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству: (сборник) . – Материалы III Международной интернет - конференции. – Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2010. – С. 16-20.
30. Зацепина О.В. Современные представления о свойствах и функциях ядрышка: ядрышко как мишень стрессовых воздействий на клетки // Цитология. – 2007. – 53 (9): 748-749.
31. Зыбина О.А. и др. Проблемы адгезии огнезащитных вспучивающихся тонкослойных покрытий по металлу // Химическая промышленность. – 2003. – № 3. – С.38-39.
32. Ильинская Н.Б., Иордан М.С. Методика определения стадии физиологической зрелости личинок хирономид IV возраста по структуре и

величине зародышевых дисков. В кн.: Матер. 1 (IX) заседания рабочей группы по проекту №18 «Вид и его продуктивность в ареале». – Вильнюс, 1975. – С. 17-22.

33. Каплуненко В. Г., Косинов Н. В., Бовсуновский А. Н., Черный С. А. Нанотехнологии в сельском хозяйстве // Зерно. – 2008. – №4 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.zerno-ua.com/?p=2025>, дата обращения 12.07.2015.

34. Ким С. От углеродных волокон – к нанотрубкам // The Chemical Journal. – 2009. – С. 60-65.

35. Кирпичников М.П. Нанобезопасность: лекция, 2009. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://nano.msu.ru/files/basics/lecture_Kirpichnikov.pdf, дата обращения 15.06.2015

36. Киселев В.Н. Основы экологии. Минск: Высшая школа. – 2002. – 383 с.

37. Коваленко Л.В., Фолманис Г.Э. Биологически активные нанопорошки железа. – Москва: Наука, 2006. – 126 с.

38. 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. 64-73.

39. Концепция участия государственной корпорации «Российская корпорация нанотехнологий» в совершенствовании законодательства от 28.04.2008: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rusnano.com/Document.aspx/Download/14838> (дата обращения: 18.07.2015).

40. Коросов А.В., Калинкина Н.М. Количественные методы экологической токсикологии. – Петрозаводск: ПетрГУ, КНЦ. – 2003. – 56 с.

41. Косолапова Н.И., Миронов С.Ю., Лепина А.Ю., Кобыльской С.Г. Исследование влияния многослойных углеродных нанотрубок на ферментативную активность чернозема типичного // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – № 1–8. – том 12. – С. 2133-2136.
42. Ларин И.В., Бечучев П.П., Работнов Т.А., Леонтьева И.П. Луговое хозяйство и пастбищное хозяйство. – Л: Колос, 1975. – 528 с.
43. Ларин И.В., Доброхотов А.С. Пастбищное содержание скота. – Л.: Лениздат, 1951. – 212 с.
44. Лысцов В.Н., Мурзин Н.В. Проблемы безопасности нанотехнологий. - М., МИФИ. - 2007. - 70 с.
45. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. Федеральный реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03223. – М., – 2011.
46. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». – ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2.3:3.8-04. – М., 2004.
47. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. Федеральный реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03221. – Москва «АКВАРОС» . – 2007.
48. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). Под редакцией проф. Саноцкого И.В. М. Изд-во «Медицина». – 1970. – 344 с.
49. Микроскопическая техника: Руководство. Под редакцией Саркисова Д.С. и Петрова Ю.Л. – М.: Медицина. – 1996. – 544 с.
50. Михальчук А., Выращивание высоких урожаев эспарцета. – МСХ и заготовок СССР. – 1953. – 24 с.

51. Мищенко С.В., Ткачёв А.Г. Углеродные наноматериалы. Производство, свойства, применение. – М.: Машиностроение, 2008. – 320 с.

52. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека МР 1.2.2522-09. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2009а. – 35 с.

53. Методические рекомендации. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*. МР 1.2.2566-09. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009б. – 69 с.

54. Методические рекомендации. Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов. МР 1.2.2640-10. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2010. – 49 с.

55. Методические рекомендации. Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах. МР 1.2.2641-10. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2010. – 103 с.

56. Методические указания. Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях. МУ 1.2. 2742-10. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 – 50 с.

57. Методические указания. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов. МУ 1.2.2520-09. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2009. – 43 с.

58. Методические указания. Гигиена, токсикология, санитария. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза. МУ 1.2.2634-10. 1.2.

(утв. Роспотребнадзором 24.05.2010) // М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2010.

59. Назарова А.А., Полищук С.Д. Влияние ультрадисперсных форм металлов на урожайность и качество кукурузы и подсолнечника в условиях засухи 2010 года // Материалы научно-практической конференции «Интеграция науки с сельскохозяйственным производством». – Рязань: Изд-во РГАТУ, 2011. – С.57-59.

60. Нанокосметика [Электронный ресурс] – Режим доступа: www.nanosvit.ucoz.ru, дата обращения 12.07.2015.

61. Новая дисциплина – нанотоксикология [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://perst.issp.ras.ru/Control/Inform/perst/2007/7_19/n.php?file=perst.htm&label=E_07_19_5, дата обращения 12.07.2015.

62. Носки-47 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.noski47.tu1.ru>, дата обращения 12.07.2015.

63. О безопасности: Федеральный закон от 28.12.2010 № 390-ФЗ // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2011. – № 1. – Ст. 2.

64. О качестве и безопасности пищевых продуктов: Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2000. – № 2. – Ст. 150.

65. О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы: Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23.07.2007 № 54 // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. – 2007. – № 4.

66. Об утверждении и внедрении методических рекомендаций «Оценка безопасности наноматериалов: Приказ Роспотребнадзора от 12.10.2007 № 280 // М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2007.

67. Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов: Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31.10.2007 № 79 // Российская газета. – 2007. – № 270.

68. Об экспортном контроле: Федеральный закон от 18.07.1999 № 183-ФЗ // Собрание законодательства Российской Федерации. – 1999. – № 30. – Ст. 3774.

69. Павлов Г.В. Использование ультрадисперсных порошков в сельском хозяйстве // Достижение науки и техники в АПК. – 2002. – №3. – С. 3-8.

70. Паду Э. Х. Свойства пероксидазы и фенилаланин–аммиак–лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы // Физиол. растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 408–415.

71. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1974. – 288 с.

72. ПерсТ [Электронный ресурс] – Режим доступа http://perst.issp.ras.ru/Control/Inform/perst/2009/9_09/n.php?file=perst.htm&label=N_9_09_14, дата обращения 12.07.2015.

73. ПерсТ [Электронный ресурс] – Режим доступа http://perst.issp.ras.ru/Control/Inform/perst/2010/10_05/n.php?file=perst.htm&label=L_10_5_12, дата обращения 12.07.2015.

74. ПерсТ 16, вып. 4, с. 5 (2009).

75. Попов К.И., Филиппов А.Н. Пищевые нанотехнологии: перспективы и проблемы. – М.: Издательский комплекс МГУПП, 2009. – 172 с.

76. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска,

методов идентификации и количественного определения наноматериалов» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2007. – № 30. – ст. 3753.

77. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 года № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2001. – № 1. – ст. 123.

78. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 года № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2001. – № 1. – ст. 124.

79. Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А., Кузьмин С.В. Экологическая эпидемиология: принципы, методы, применение. – Екатеринбург, 2003. – 276 с.

80. Приказ Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08.2010 года «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 № 18713) / «Российская газета». – № 240. – 22.10.2010.

81. Приказ Министерства природных ресурсов РФ от 15 июня 2001 г. № 511 "Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды"

82. Приказ Росрыболовства от 04.08.2009 № 695 «Об утверждении методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_91976/ (дата обращения: 18.07.2015).

83. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=LAW;n=104735;fld=134;from=70023-29;rnd=0.8498437635903991> (дата обращения: 18.07.2015).

84. Проект: «Разработка методологии и создание средств контроля для оценки безопасности действия наноматериалов на аппарат наследственности». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.portalnano.ru/read/iInfrastructure/russia/nns/orehov/pr_1 (дата обращения: 18.07.2015).

85. Райкова А.П., Паничкин Л.А., Райкова Н.Н. Исследование влияния ультрадисперсных порошков металлов, полученных различными способами, на рост и развитие растений // Материалы Международной научно-практической конференции «Нанотехнологии и информационные технологии – технологии XXI века» . – Москва, 2006. – С. 108-111.

86. Райкова А.П., Паничкин Л.А., Райкова Н.Н. Использование ультрадисперсных порошков металлов для предпосевной обработки семян, Доклады ТСХА. – М., 2003. – С. 81-84.

87. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 7.07.2011 №1192-р «Категории продукции nanoиндустрии в части товаров и услуг». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?base=LAW;frame=16;n=115682;req=doc> (дата обращения: 18.07.2015).

88. Ревич Б.А., Авалиани С.Л., Тихонова Г.И. Экологическая эпидемиология. Учебник для высших учебных заведений. Под редакцией Б. А. Ревича. – М., 2004. – 384 с.

89. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Пер. с англ. – Wash. DC.: National Academy Press. – 2001. – 138 с.

90. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Фисенко В.П. – М.: Ремедиум. – 2000. – 398 с.

91. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств. Под ред. Р.У. Хабриева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина». – 2005. – 832 с.

92. Сармосова А.Н. Влияние ультрадисперсных порошков металлов и биологически активных веществ на урожайность капусты белокачанной и устойчивость растений к болезням: автореф. дис. ... к. с.-х.н. – Москва, 2002. – 26 с.

93. Саяпина Н.В., Сергиевич А.А., Баталова Т. А., Новиков М.А., Асадчева А., Чайка В.В., Голохваст К.С. Экологическая и токсикологическая опасность углеродных нанотрубок: обзор российских публикаций // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014. – №5-2. – С. 949-953.

94. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А., Румянцева Н.И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет. – 2011. – 61 с.

95. Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапов П.Б., Сорокина Г.Л., Кислин Е.Н. Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост // Агрехимия. – 1999. – № 8. – С. 49–53.

96. 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. 106-113.

97. Смольникова Н.М., Чиркова Е.М, Голованова И.В., Рудаков А.Г., Верстакова О.Л., Любимов Б.И., Скосырева А.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств №98/304 (утв. Минздравом РФ 29.04.1998). Москва. 1998 [Электронный ресурс] – Режим доступа:

<http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/promyshlennost/35/metodicheskie-rekomendacii-po-doklinicheskomu-izucheniyu-reproduktivnoj-toksichnosti-farma.html>), дата обращения 15.06.2015

98. Ткачев А.Г., Золотухин И.В. Аппаратура и методы синтеза твердотельных наноструктур. Монография. – М.: Издательство Машиностроение-1, 2007. – 316 с

99. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Васильева О.Л., Залялов Р.Р., Валеева И.Х., Мустафин И.Г., Шведова А.А. Пилотное кросс-секционное исследование по оценке потенциального фиброгенного риска в условиях реальных экспозиций к аэрозолю многослойных углеродных нанотрубок на рабочих местах // Казанский медицинский журнал. - 2013. - №5. - С.770-774.

100. Федеральный закон от 27.06.2011 г. №1192-р -ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2011. – № 27. – ст. 3875.

101. Федеральный закон Российской Федерации от 10.01.2002 года № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2002. – № 2. – ст. 133.

102. Федеральный закон Российской Федерации от 27 декабря 2002 года № 184-ФЗ «О техническом регулировании» // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2002. – № 52. – ст. 5140.

103. Федеральный закон Российской Федерации от 30 марта 1999 года № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

// Собрание законодательства Российской Федерации. – 1999. – № 14. – ст. 1650.

104. Фёдорова И.А. Методические подходы к анализу токсикологических и цитогенетических эффектов холинотропных препаратов на личинках *Chironomus* (Diptera) in vivo в остром эксперименте // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2009. – № 12. – С. 58-65.

105. Фолманис Г.Э., Коваленко Л.В. Ультрадисперсные металлы в сельскохозяйственном производстве. – М.: ИМЕТ РАН, 1999. – 80 с.

106. Фостер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации, возможности. - Москва: Техносфера. - 2008. - 352 с.
107. Халиуллин Т. О. Гигиеническая оценка производства многослойных углеродных нанотрубок с изучением медико-биологических эффектов фактических ингаляционных экспозиций : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Казань, 2013. – 19 с.
108. Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР // П. М. Царенко, отв. ред. Г. М. Паламарь-Мордвинцева. – К.: Наукова думка. – 1990. – 208 с.
109. Чурилов Г.И. Влияние нанопорошков железа, меди, кобальта в системе почва – растение // Вестник Оренбургского Госуниверситета. – 2009. – №12 (106) . – С.148-151.
110. Чурилов Г.И. Экологические аспекты действия нанокристаллической меди на систему почва-растения-животные // Вестник СамГУ - Естественнонаучная серия. 2009. – №6(72) . – С. 206-212.
111. Чурилов Г.И. Эколого-биологические эффекты нанокристаллических металлов: дис. ... д.б.н. . – Балашиха, 2010. – 321 с.
112. Чурилов Г.И., Иванычева Ю.Н., Полищук С.Д. Влияние ультрадисперсного порошка кобальта на биологическую активность полисахаридов *Poligonum aviculare* (горца птичьего) // Рос. Медико-биологический вестник. – 2009. – №1. – С. 26-32.
113. Чурилов Г.И., Назарова А.А, Полищук С.Д., Сушилина М.М. Рекомендации по использованию ультрадисперсных порошков металлов (нанометаллов) в сельскохозяйственном производстве. – Рязань, 2010. – 51 с.
114. Чурилов Г.И., Назарова А.А., Амплеева Л.Е., Полищук С.Д. Черкасов О.В. Биологическое действие наноразмерных металлов на различные группы растений. Монография. – Рязань, 2010. – 148 с.
115. Чурилов Г.И. Действие нанокристаллических металлов на эколого-биологическое состояние почвы и накопление биологически активных соединений в растениях // Вестник Рос. Университета дружбы народов.

Серия – экология и безопасность жизнедеятельности. – 2010. – № 1. . – С. 18-23.

116. Чурилов, Г.И. Полисахариды растений рода горец и лапчатка: выделение, строение, биологическое действие и влияние на их свойства нанокристаллических металлов: Монография. – Рязань, 2007. – 156 с.

117. Чурилов Г.И., Амплеева Л.Е Увеличение урожайности вики при обработке семян нанопорошками // Научное обеспечение конкурентоспособности племенного, спортивного и продуктивного коневодства в России и странах СНГ: сб. науч. тр. – Дивово: ВНИИК, 2007. – Часть 2. – С. 196-199.

118. Чурилов Г.И., Амплеева Л.Е., Иваннычева Ю.Н. Действие ультрадисперсных железа и кобальта на накопление белка в бобовых культурах // Экологическое состояние природной среды и научно-практические аспекты современных мелиоративных технологий: сб. науч. тр. – Вып. 3. – Рязань. 2008. – С. 306-309.

119. Эспарцет (Монография). Отв. ред. Власюк И.И. – М., Сельхозгиз – 1951. – 151 с.

120. A Matter of Size: Triennial Review of the National Nanotechnology Initiative. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.nap.edu/catalog/11752.html>, дата обращения 18.07.2015.

121. Abu-Hijleh M.F., Habbal O.A., Moqattash S.T. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity // Journal of Anatomy. – 1995. – 18, 453-467.

122. Adams L.K., Lyon D.Y., McIntosh A., Alvarez P.J. Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions // Water Science and Technology. – 2006. – No.54. – P. 327–334.

123. Aeby H. Catalase in vitro // Methods Enzymol. – 1984. – V. 105. – P. 121–126.

124. Aschberger K., Johnston H.J., Stone V., Aitken R.J., Hankin S.M., Peters S.A.K., Lang Tran C., Christensen F.M. Review of carbon nanotubes

toxicity and exposure – appraisal of human health risk assessment based on open literature // *Critical Reviews in Toxicology*. - 2010. – V40(9) . – P. 759–790/

125. Bai Y., Zhang Y., Zhang J. Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility // *Nature Nanotechnology*. – 2010. – Vol. 5. – P. 683-689.

126. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? // *The Lancet*. – 2001. – 357(9255), 539-545.

127. Basic Concepts of Risk Characterisation and Risk Governance. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.irgc.org/irgc/projects/risk_characterisation/_b/contentFiles/IRGC_fact_sheet_Basic_Concepts_of_Risk.pdf, дата обращения 18.07.2015.

128. Beermann W. // *Chromosoma* – 1973. – 41, 297–326.

129. Begum P., Fugetsu B. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant // *J Hazard Mater*. – 2012. – 243:212–222.

130. Bell I.R., Ives J.A., Jonas W.B. Nonlinear effects of nanoparticles: biological variability from hormetic doses, small particle sizes, and dynamic adaptive interactions // *Dose-Response*. – 2014. – 12:202–232.

131. Bellucci S. (ed.). Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications. Lecture Notes in Nanoscale Science and Technology 7. – 2009. – Springer-Verlag Berlin. – Heidelberg.

132. Bentley R., Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria // *Microbiol. Rev*. – 1982. – 46 (3): 241–80.

133. Binder W.H., Sachsenhofer R., Farnik D., Blaas D. Guiding the location of nanoparticles into vesicular structures: A morphological study // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2007. – V. 9. – Issue 48. – P. 6435–6441.

134. Blaser S.A., Scherlinger M., Macleod M., Hungerbuhler K. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles // *Sci Total Environ* 2008. – 390:396–409.

135. Braner K.A., Fisher S.W. // *J. Environ. SÒi. health. Part. A.* – 1993. – A28:6, 1341–1360.
136. Browning L.M, Lee K.J., Huang T., Nallathamby P.D., Lowman J.E., Xu X.H. Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments // *Nanoscale.* – 2009. – 1:138-152.
137. Casey A., Herzog E., Davoren M., Lyng F., Byrne H., Chambers G. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity // *Carbon.* – 2007. – 45(7). – P. 1425-1432.
138. Chehab E.W., Eich E., Braam J. Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation // *J Exp Bot.* – 2009. – 60(1):43-56, doi: 10.1093/jxb/ern315.
139. Chen Zh., Meng H., Yuan H., Xing G., Chen Ch., Zhao F., Wang Y., Zhang Ch., Zhao Yu. Identification of target organs of copper nanoparticles with ICP-MS technique // *J Radioanal Nucl Chem.* – 2007. – 272(3):599-603, doi: 10.1007/s10967-007-0631-1.
140. Chibante L.P., Heymann D. On the geochemistry of fullerenes: stability of C60 in ambient air and the role of ozone // *Geochimica and Cosmochimica Acta.* – 1993. – V.57. – P. 1879-1881.
141. Congressional Record - 111th Congress (2009-2010). Statements on introduced bills and joint resolutions. The Library of Congress. – January 21. – 2010.
142. Corredor E., Testillano P.S., Coronado M.J., González-Melendi P., Fernández-Pacheco R., Marquina C., Ibarra M.R., de la Fuente J.M., Rubiales D., Pérez-de-Luque A., Risueño M.C. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification // *BMC Plant Biol.* – 2009. – Apr 23;9:45. doi: 10.1186/1471-2229-9-45.

143. Da Silva L.C., Oliva M.A., Azevedo A.A., De Araujo J.M. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory // *Water, Air and Soil Pollution*. –2006. – No.175. – P. 241-256.
144. Dayeh V., Chow S.L., Schirmer K., Lynn D.H., Bols N.C. Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. . – 2004. – 57(3):375-82, doi: 10.1016/S0147-6513(03)00083-6.
145. DeRosa M.C., Monreal C., Schnitzer M., Walsh R., Sultan Y. Nanotechnology in fertilizers // *Nature nanotechnology*. – 2010. – 5(2):91-91.
146. Derreck M. Harber, Sunny S. Wicks, Brian L. Wardle. Health Monitoring of Carbon Nanotube (CNT) Enhanced Composites.
147. Diez L., Santa Cruz M., Villanueva A. Aller P. // *Ibid.* – 1980. – 81, 263–269.
148. Donaldson K., Murphy F. A., Duffin R., Poland C. A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma // *Part Fibre Toxicol.* – 2010. – 7:5, doi:10.1186/1743-8977-7-5.
149. Donaldson K., Poland C., Duffin R. *The Toxicology of Carbon Nanotubes*. – Cambridge University Press. – 2012. – 264 p.
150. Donaldson K., Poland C.A., Murphy F.A., MacFarlane M., Chernova T., Schinwald A. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos – Similarities and differences // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65. – No 15, P. 2078–2086.
151. Donaldson K., Stone V., Tran C.L., Kreyling W., Borm P.J.A. Nanotoxicology // *Occup Environ Med.* - 2004. - 61:727-728 doi:10.1136/oem.2004.013243.
152. Dong L., A. Henderson A., Field Ch. Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes Suspended in Different Surfactants. *Journal of Nanotechnology*. – 2012. – V. 2012, doi:10.1155/2012/928924.

153. Du J., Wang S., You H., Zhao X. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: a review // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2013. – Vol. 36. – No 2, P. 451-462.
154. E. Clayton Teague. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.nsti.org/outreach/NNCO/>, дата обращения 18.07.2015.
155. Edgington A.J., Roberts A.P., Taylor L.M., Alloy M.M., Reppert J., Rao A.M., Mao J., Klaine S.J. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes // *Environ Toxicol Chem*. – 2010. - Nov; 29(11):2511-8. doi: 10.1002/etc.309
156. Elsaesser A., Howard C.V. Toxicology of nanoparticles // *Adv Drug Deliv Rev*. - 2012. - Feb; 64(2):129-37. doi: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
157. El-Temsah Y.S., Joner E.J. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil // *Environ. Toxicology*. – 2012. – 27. – P. 42–49.
158. Environmental, Health, and Safety Research Needs for Engineered Nanoscale Materials. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.nano.gov/NNI_EHS_research_needs.pdf, дата обращения 18.07.2015.
159. Frankland B., Wareing P. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings // *Nature*. – 1960. – V. 185. – No 4706. – P. 255–256.
160. Fujitani T., Ohyama K., Hirose A. Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice // *J. Toxicol. Sci*. – 2012. – Vol. 37. – No. 1. – P. 81-89.
161. Geller W., Mueller H. The filtration apparatus of cladocera – filter mesh-sizes and their implications on food selectivity // *Oecologia*. – 1981. – V.49. – P.316-321.
162. Godymchuk A. Yu., Savel`ev G. G., Gorbatenko D. V. Dissolution of Copper Nanopowders in Inorganic Biological Media // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2010. – Vol. 80. – Issue 5. – P. 881-888.

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

164. Grens K. Nanotechnology report urges better safety standards. Mostly positive findings on the National Nanotechnology Institute suggest safety and measuring economic returns as areas for improvement. – Published 26th September 2006.

165. Gusev A.I. Rempel A.A. *Nanocrystalline Materials*. - Cambridge: Cambridge International Science Publishing, 2004. 351 p.

166. Handy R.D., Henry T.B., Scown T.M., Johnston B.D., and Tyler C.R. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish – a mechanistic analysis // *Ecotoxicology*. – 2008. – No.17. – P.396-409.

167. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors // *Environmental Health Perspectives*. – 2006. – V.114. – P.165–172.

168. Hartman K., Kolosnjaj J., Gharbi N., Boudjemaa S. Wilson L.J., Moussa F. Comparative *In vivo* Toxicity Assessment of Singlewalled Carbon Nanotubes in Mice // *The 211th Meeting of The Electrochemical Society, Chicago, USA*. – 2007. – May 6-10.

169. Hong F.S., Yang F., Liu C., Gao Q., Wan Z., Gu F., Wu C., Ma Z., Zhou J., Yang P Influence of nano-TiO₂ on the chloroplast aging of spinach under light // *Biol Trace Elem Res* – 2005. – 104:249–260.

170. Hougaard K.S., Jackson P., Jensen K.A. Carbon nano-tubes: Effects on gestation and reproduction // *Reproductive Toxicology*. – 2010. – Vol. 30. – P. 239.

171. Hougaard K.S., Jackson P., Kyjovska Z.O. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice / *Reproductive Toxicology*. – 2013. – Vol. 41. – P. 86-97.

172. Huczko A., Lange H. Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy // Fullerene Science and Technology. – 2001. – 9(2), 247-250.

173. Iavicoli I., Calabrese E.J., Nascarella M.A. Exposure to nanoparticles and hormesis // Dose-Response. – 2010. – 8:501-517.

174. IFCS/Forum-VI/01.TS, 2008 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.iisd.ca/vol15/enb15160e.html>, дата обращения 15.06.2015.

175. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon // Nature. - 1991. - 354 56

176. International Risk Governance Council, White Paper – Nanotechnology Risk Governance. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.irgc.org/irgc/_b/contentFiles/IRGC_white_paper_2_PDF_final_version.pdf, дата обращения 18.07.2015.

177. International Risk Governance Council, White paper – Risk Governance towards an Integrative approach. [Электронный ресурс] – Режим доступа: [http://www.irgc.org/irgc/projects/risk_characterisation/_b/contentFiles/IRGC_WP_No_1_Risk_Governance_\(reprinted_version\).pdf](http://www.irgc.org/irgc/projects/risk_characterisation/_b/contentFiles/IRGC_WP_No_1_Risk_Governance_(reprinted_version).pdf), дата обращения 18.07.2015.

178. IRGC Workshop on International Risk Governance Framework. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.irgc.org/irgc/projects/nanotechnology/_b/contentFiles/IRGC_January_Workshop_Chairmans_Statement__Risk_Governance_of_Nanotechnology.pdf, дата обращения 18.07.2015.

179. IRGC, Survey on Nanotechnology Governance. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.irgc.org/irgc/projects/nanotechnology/_b/contentFiles/Survey_on_Nanotechnology_Governance_-_Part_A_The_Role_of_Government.pdf, дата обращения 18.07.2015.

180. Isenberg et al. // *Manual of Clinical Microbiology*. Edwin H. Lennette, Albert Balows. William J. Hausler, J. R., M. Jean Shadomy, (eds.) 4th Ed. American Society for Microbiology, Washington. D.C. – 1985. – pp. 73-98.
181. ISO Standards - TC 229 – Nanotechnologies. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.iso.org>, дата обращения 23.07.2015.
182. ISO/TR 12885:2008 – Nanotechnologies – Health and safety practices in occupational settings relevant to nanotechnologies – 2008. – 79 p.
183. ISO/TR 13121: 2011 – Nanotechnologies – Nanomaterial risk evaluation – 2011. – 58 p.
184. Ivani S., Karimi I., Tabatabaei S.R. Biosafety of multiwalled carbon nanotube in mice: a behavioral toxicological approach // *J. Toxicol. Sci.* – 2012. – Vol. 37. – No. 6. – P. 1191-1205.
185. Jackson P., Jacobsen N.R., Baun A., Birkedal R., Kühnel D., Jensen K. A., Vogel U., Wallin H. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes // *Chemistry Central Journal*. – 2013. - 7:154. doi:10.1186/1752-153X-7-154.
186. Jia G., Wang H.F., Yan L., Wang X., Pei R.J., Yan T., Zhao Y.L., Guo X.B. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene // *Environmental Science and Technology*. – 2005. – V.39. – P.1378-1383.
187. Jiang J., Oberdörster G., Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies // *J Nanopart Res.* – 2009. – 11:77–89.
188. Kagan V.E., Konduru N.V., Feng W., Allen B.L., Conroy J., Volkov Yu., Vlasova I.I., Belikova N. A., Yanamala N., Kapralov A., Tyurina Yu.Y., Shi J., Kisin E.R., Murray A.R., Franks J., Stolz D., Gou P., Klein-Seetharaman J., Fadeel B., Star A., Shvedova A.A. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation // *Nature Nanotechnology*. – 2010. – 5, 354-359, doi:10.1038/nnano.2010.44.
189. Kane A.B., Hurt R.H. Nanotoxicology: The asbestos analogy revisited // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – 3(7), 378-379.

190. Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., Elimelech M. Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! // *Langmuir*. – 2008. – 24 (13) . – P. 6409–6413.
191. Kang S., Mauter M.S., Elimelech M. Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent // *Environmental Science & Technology*. – 2009. – 43 (7). – P. 2648–2653.
192. Kashiwada S. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzia slatipes*) // *Environmental Health Perspectives*. – 2006. – V.114. – P. 1697-1702.
193. Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F., Biris A.S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth // *ACS Nano*. - 2009. - Oct 27; 3(10):3221-7. doi: 10.1021/nn900887m.
194. Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects // *Environ Toxicol Chem*. - 2012. - Dec; 31(12):2893.
195. Kobayashi N., Naya M., Ema M., Endoh S., Maru J., Mizuno K., Nakanishi J. Biological response and morphological assessment of individually dispersed multiwall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats // *Toxicology*. – 2010. – 276(3), 143-153.
196. Kolosnjaj-Tabi J., Hartman K.B., Boudjemaa S., Ananta J. S., Morgant G., Szwarc H., Moussa F. In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice // *Acs Nano*. – 2010. – 4(3), 1481-1492.
197. Kshitij Aditeya S., Morrison M.. Risk Governance in Nanotechnology. Institute of Nanotechnology. – 2007.
198. Lahiani M.H., Dervishi E., Chen J., Nima Z., Gaume A., Biris A.S., Khodakovskaya M.V. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable

crops // ACS Appl Mater Interfaces. – 2013. – Aug 28;5(16):7965-73. doi: 10.1021/am402052x.

199. Lai-Fook S.J. Pleural mechanics and fluid exchange // *Physiological reviews*. – 2004. – 84(2), 385.

200. Lam C.W., James J.T., Cluskey R., Arepalli S., Hunter R. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2006. – Vol. 36, P. 189-217.

201. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation // *Toxicol Sci.*- 2004.- Jan; 77(1):126-34.

202. Lee Ch.W., Mahendra Sh., Zodrow K., Li D., Tsai Y., Braam J., Alvarez P. Developmental phytotoxicity of metaloxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2010. – Vol. 29. – No. 3. – pp. 669–675.

203. Lijima S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon // *Nature* 354. – 1991. - 56–58.

204. Lim J.H., Kim S.H., Shin I.S. Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats // *Birth Defects Res. B Dev Reprod Toxicol*. – 2011. – Vol. 92. – No. 1. – P. 69-76.

205. Lin B.S., Diao S.Q., Li C.H., Fang L.J., Qiao S.C., Yu M. Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai Larch seedlings // *J For Res – CHN*. – 2004. – 15:138–140.

206. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth // *Environmental Pollutants*. – 2007. – Vol. 150. – Iss. 2. – pp. 243-250.

207. Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J., Reid M., Ratnikova T., Rao A., Luo H., Ke P. Uptake, Translocation, and Transmission of Carbon Nanomaterials in Rice Plants // *Small*. – 2009. – 5(10):1128–1132.

208. Liu Q., Chen B., Wang Q., Shi X., Xiao Z., Lin J. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells // *Nano Lett.* – 2009. – 9:1007.
209. Liu Z., Davis C., Cai W., He L., Chen X., Dai H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2008. – 105(5), 1410.
210. Lu C.M., Zhang C.Y., Wen J.Q., Wu G.R., Tao M.X. Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of Glycine max and its mechanism // *Soybean Sci.* – 2002. – 21:168–172.
211. Luyts K., Smulders S., Napierska D., Van Kerckhoven S., Poels K., Scheers H., Hemmeryck B., Nemery B., Hoylaerts M.F., Hoet P.H.M. Pulmonary and hemostatic toxicity of multi-walled carbon nanotubes and zinc oxide nanoparticles after pulmonary exposure in Bmal1 knockout mice // *Particle and Fibre Toxicology.* – 2014. – Vol.11. – P. 61 (15 p.)
212. Lyon D.Y., Thill A., Rose J., Alavarez P.J. Ecotoxicological impacts of nanomaterials // Weisner, M.R., Bottero, J-Y. *Environmental Nanotechnology: Applications and Implications of Nanomaterials.* – New York: McGraw-Hill.– 2007. – P. 445–479.
213. Ma X., Geiser–Lee J., Deng Y., Kolmakov A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation // *Sci. Total Environ.* – 2010. – V. 408. – P. 3053–3061.
214. Madden A.S., Hocella M.F.J, Luxton T.P. Insights for size-dependent reactivity of hematite nanomineral surfaces through Cu²⁺ sorption // *Geochimica and Cosmochimica Acta.* – 2006. – V.70. – P. 4095-4104.
215. [Mailto:mail@the-scientist.com](mailto:mail@the-scientist.com) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <mailto:mail@the-scientist.com>, дата обращения 18.07.2015.
216. Manchikanti P., Bandopadhyay T.K. Nanomaterials and Effects on Biological Systems: Development of Effective Regulatory Norms // *Nanoethics* 4. – 2010. - 77–83.

217. Maynard A. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.wilsoncenter.org/index.cfm?topic_id=166192&fuseaction=topics.profile&person_id=166223, дата обращения 18.07.2015.

218. Maynard A., Baron P., Foley M., Shvedova A., Kisin E., Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material // *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A.* – 2004. – 67(1). – P. 87-107.

219. Meeting of Competent Authorities for REACH and CLP. 25-26-27 October 2010. EUROPEAN COMMISSION. Brussels, 24 February 2011, Doc. CA/02/2011.

220. Mercer R.R., Hubbs A.F., Scabilloni J.F., Wang L., Battelli L.A., Schwegler-Berry D., Porter D.W. Distribution and persistence of pleural penetrations by multiwalled carbon nanotubes // *Particle and Fibre Toxicology.* – 2010. – 7 (1), 28.

221. Metcalfee C., Bennettm E., Chappell M., Steevens J., Depledge M., Goss G., Goudey S., Kaczmar S., O'Brien N., Picado A. Strategic Management and Assessment of Risks and Toxicity of Engineered Nanomaterials (SMARTEN) in Nanomaterials: Risks and Benefits. Ed. by I. Linkov and J. Steevens. //Springer, Dordrecht. – 2009. - pp. 95–102.

222. Michailova P., Acad C.R. Bulgare. Sci. – 1985. – 38, 297–326.

223. Monica J.C. Jr. // White House Issues Nanotechnology EHS Policy Statement. – 10.6.2010.

224. Montes-Burgos I., Walczyk D., Hole P., Smith J., Lynch I., Dawson K. Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies // *J Nanopart Res.* – 2010. – 12:47–53.

225. Moore M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // *Environmental Internatiopnal* – 2006. – No.32. – P. 967-976.

226. Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., Oyabu T., Myojo T., Todoroki M., Lee B. W. Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes

following inhalation and intratracheal instillation // *Nanotoxicology*. – 2011. – (0), 1-15.

227. Mueller N., Nowack B. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment // *Environmental Science and Technology*. – 2008. – V. 42. – P. 4447-4453.

228. Muller J., Huaux F., Fonseca A., Nagy J.B., Moreau N., Delos M., Fenoglio I. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: Toxicological aspects // *Chemical research in toxicology*. – 2008. – 21(9), 1698-1705.

229. Muller J., Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J. F., Delos M., Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2005. – 207(3), 221-231.

230. Murphy F.A., Poland C.A., Duffin R., Al-Jamal K.T., Ali-Boucetta H., Nunes A., Li S. Length-Dependent Retention of Carbon Nanotubes in the Pleural Space of Mice Initiates Sustained Inflammation and Progressive Fibrosis on the Parietal Pleura // *The American Journal of Pathology*. – 2011. – 178(6), 2587-2600.

231. Murr L E., Guerrero P.A. Carbon nanotubes in wood soot // *Atmos. Sci. Let.* - 2006. - 7: 93 – 95. doi:10.1002/asl.138.

232. Murr L.E., Esquivel E.V., Bang J.J., de la Rosa G., Gardea-Torresdey J.L. Chemistry and nanoparticulate compositions of a 10,000 year-old ice core melt water // *Water Res.* – 2004. - Nov; 38(19):4282-96.

233. Murr L.E., Garza K.M. Natural and anthropogenic environmental nanoparticulates: their microstructural characterization and respiratory health implications // *Proceedings of the Workshop at Centro Stefano Franscini «Nanoparticles in the Environment: Implications and Applications»*. – 2008. – MonteVerita, Ascona, Switzerland.

234. Murr L.E., Soto K.F., Garza K.M., Guerrero P.A., Martinez F., Esquivel E.V., Ramirez D.A., Shi Y., Bang J.J., Venzor J. 3rd. Combustion-generated nanoparticulates in the El Paso, TX, USA / Juarez, Mexico Metroplex:

their comparative characterization and potential for adverse health effects // *Int J Environ Res Public Health*. – 2006. - Mar; 3(1):48-66.

235. Murray A.R., Kisin E., Leonard S.S., Young S.H., Kommineni C., Kagan V.E., Castranova V., Shvedova A.A. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes // *Toxicology*. – 2009. – Mar 29;257(3):161-71, doi: 10.1016/j.tox.2008.12.023.

236. Mutlu G.M., Budinger G.R.S., Green A.A., Urich D., Soberanes S., Chiarella S.E., Hersam M. C. Biocompatible nanoscale dispersion of single-walled carbon nanotubes minimizes in vivo pulmonary toxicity // *Nano letters*. – 2010. – 10(5), 1664-1670.

237. NanoRegulation – A multistakeholder approach towards a sustainable regulatory framework for nanotechnologies and nanosciences. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.innovationsgesellschaft.ch/images/publikationen/Nano_Regulation_final3.pdf, дата обращения 18.07.2015.

238. Nanotechnology. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.irgc.org/irgc/projects/nanotechnology/_b/contentFiles/IRGC_fact_sheet_Nanotechnology.pdf, дата обращения 18.07.2015.

239. Nascarella M.A., Calabrese E.J. A method to evaluate hormesis in nanoparticle dose-responses // *Dose-Response*. – 2012. – 10:344-354.

240. National Nanotechnology Initiative. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.nano.gov/>, дата обращения 18.07.2015.

241. National Research Council. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.nas.edu/nrc/>, дата обращения 18.07.2015.

242. Neal A.L. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? // *Ecotoxicology*. – 2008. – V.17. – P. 362–371.

243. Neely B., Morris P.J., Shields J.P., Sutter A.G., Bearden D.W., Bertsch P.M. Microbial growth affects of FeO nanoparticle structure and toxicity //

Proceedings of the Annual Meeting of Society for Environmental Chemistry and Toxicology, North America, Milwaukee, WI, USA. – 2007. – 19–23 November.

244. Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M.V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface // *Nature materials*. - 2009. - 8 (7), 543-557.

245. Oberdorster E., Zhu S.Q., Blickley T.M., Clellan-Green P., Haasch M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene (C60) on aquatic organisms // *Carbon*. – 2006. – V.44. –P.1112-1120.

246. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // *Environmental Health Perspectives*. - 2005. - 7 (113). 823-839.

247. Ostin A., Kowalyczk M., Bhalerao R.P., Sandberg G. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. – 1998. – Sep;118(1):285-96 ; Woodward A.W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction // *Ann Bot*. – 2005. – Apr;95(5):707-35

248. Ostrowski A.D., Martin T., Conti J., Hurt I., Harthorn B.H.. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007. – *J Nanopart Res*. – 2009. – 11:251–257.

249. Petra J., Jacobsen N.R., Baun A., Birkedal R., Kühnel D., Jensen K.A., Vogel U., Wallin H. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes // *Chemistry Central Journal*. - 2013. - 7:154/

250. Pietroiusti A., Massimiani M., Fenoglio I., Colonna M., Valentini F., Palleschi G., Bergamaschi A. Low Doses of Pristine and Oxidized Single Wall Carbon Nanotubes Affect Mammalian Embryonic Development // *Acs Nano*. – 2011. – 5(6), 4624-4633.

251. Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W.A., Seaton A., Stone V., Brown S., Macnee W., Donaldson K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study // *Nat Nanotechnol*. - 2008 - Jul; 3(7):423-8. doi: 10.1038/nnano.2008.111.

252. Policy Brief Nanotechnology Risk Governance Recommendations for a global, coordinated approach to the governance of potential risks. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.irgc.org (дата обращения: 18.07.2015).
253. Porter D.W., Hubbs A.F., Mercer R.R., Wu N., Wolfarth M.G., Sriram K., Friend S. Mouse pulmonary dose-and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes // *Toxicology*. – 2010. – 269(2-3), 136-147.
254. Postma J. F., Breckert-de-Jong M.C., Staats N., Davids C. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 1994. – 26:2,143–148.
255. Qi W., Bi J., Zhang X. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 4352 (13).
256. Reddy A.R., Reddy Y.N., Krishna D.R., Himabindu V. Pulmonary Toxicity Assessment of Multiwalled Carbon Nanotubes in Rats Following Intratracheal Instillation // *Environ Toxicol.* – 2010. – 27 (4), 211-219.
257. Regulatory Aspects of nanomaterials. Commission of the European Communities. Brussels, 17.6.2008. – 11 p.
258. Reid G., Howard J., Gan B.S. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.* – 2001. – 9 (9): 424–8, doi:10.1016/S0966-842X(01)02132-1
259. Ren H.-X., Chen X., Liu J.-H., Gu N., Huang X.-J. Toxicity of single-walled carbon nanotube: How we were wrong? // *Materialstoday*. – Jan-Feb 2010. – Vol/ 13. – Num. 1-2.
260. Report of the Sub – Committee of Experts on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals on its twentieth session. Geneva, 7 to 9 Desember 2010. – 24 p.
261. Roberts A.P., Mount A.S., Seda B., Souther J., Quio R., Lin S., Ke P.C., Rao A.M., Klaine S.J. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna* // *EnvironmentalScienceandTechnology*. – 2007. – V.41. – P. 3025-3029.

262. Rosenkranz P., Fernandes T.F., Chaudhry Q., Stone V. Effects of a model nanoparticle and manufactured nanoparticles on *Daphnia magna* // Proceedings of the 2nd Int. Conference Nanotoxicology-2007, 19–21 April 2007, San Servolo, Venice, Italy. – P. 42-43.

263. Ryman-Rasmussen J.P., Cesta M.F., Brody A.R., Shipley-Phillips J.K., Everitt J.I., Tewksbury E.W., Andersen M.E. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice // *Nature Nanotechnology*. – 2009. – 4(11), 747-751.

264. Schipper M.L., Nakayama-Ratchford N., Davis C.R., Kam N.W.S., Chu P., Liu Z., Gambhir S. S. A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – 3(4), 216-221.

265. Schwab F., Zhai G., Kern M., Turner A., Schnoor J.L., Wiesner M.R. Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants // *Critical review Nanotoxicology*. – 2015. – Jun 11:1-22. [Epub ahead of print].

266. Serpone N., Dondi D., Albini A. Inorganic dorganic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products // *Inorganic Chimica Acta*. – 2007. – V. 360. – P. 794–802.

267. Serrano D.R., Lalatsa A., Auxiliadora Dea-Ayuela M., Bilbao-Ramos P.E., Garrett N.L., Moger J., Guarro J., Capilla J., Paloma Ballesteros M., Schätzlein A.G., Bolás F., Torrado J.J., Uchegbu I.F. Oral Particle Uptake and Organ Targeting Drives the Activity of Amphotericin B Nanoparticles // *Molecular Pharmaceutics*. – 2015. – 12 (2), 420-431 doi: 10.1021/mp500527x.

268. Service R. Chemistry: Nanotubes: The Next Asbestos? // *Science*. – 1998. – 281(5379), 941-941.

269. Sharma C. S., Sarkar S., Periyakaruppan A., Barr J., Wise K., Thomas R., Wilson B.L., Ramesn G. T. Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2007. – 7(7), 2466–2472, doi:10.1166/jnn.2007.431.

270. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R., Murray A.R., Johnson V.J., Potapovich A.I., Schwegler-Berry D. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2005. – 289(5), 698-708.
271. Stockert J.C. The normalized Balbiani size as a quantitative parameter for transcription activity in polytene chromosomes // *Biol. Zbe.* – 1990. – 109. (2): 139-146.
272. Strader L.C., Beisner E.R., Bartel B. Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response // *PlantCell*. – 2009. – V. 21. – Issue 11. – P. 3585–3590.
273. Swiss Re Publication – The insurers perspective. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.swissre.com/>, дата обращения 18.07.2015.
274. Tervonen T., Linkov I., Figueira J.R., Steevens J., Chappell M., Merad M. Risk-based classification system of nanomaterials // *J Nanopart Res.* – 2009. – 11:757–766.
275. Time to Regulate Nanoparticle Safety? *The Scientist*, Aug. 1, 2005. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.the-scientist.com/article/display/15659/#23843>, дата обращения 18.07.2015.
276. Tong Z., Bischoff M., Nies L., Applegate B., Turco R.F. Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community // *Environmental Science and Technology*. – 2007. – V.41. – P.2985-2991.
277. Tripathi S., Sonkar S. K., Sarkar S. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes // *Nanoscale*. – 2011. – 3, 1176.
278. Turgittiplakorn W., Cohen C., Kim J.-Y. Engineered polymeric nanoparticles for soil remediation // *Environment Science and Technology*. – 2004. – V.38. – P.1605-1610.

279. Vecitis Ch.D., Zodrow K.R., Kang S., Elimelech M. Electronic-Structure-Dependent Bacterial Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes // ACS Nano. – 2010. – 4 (9). – P. 5471-5479.
280. Velasco-Santos C., Martinez-Hernandez A.L., Consultchi A., Rodriguez R., Castano V.M. Naturally produced carbon nanotubes // Chemical Physics Letters. - 373. - 2003. - 272–276. doi: 10.1016/S0009-2614(03)00615-8.
281. Vilain S., Luo Y., Hildreth M., Brozel V. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – 72:4970-4977.
282. Vogt R.L., Dippold L. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. – Public Health Rep. – 2005. – 120 (2): 174–8.
283. Warheit D. What is currently known about the health risks related to carbon nanotube exposures? // Carbon. – 2006. – 44(6), 1064-1069.
284. Warheit D.B., Laurence B., Reed K.L., Roach D., Reynolds G., Webb T. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats // Toxicological Sciences. – 2004. – 77(1), 117.
285. Wild E., Jones K.C. Novel method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants // Environ Sci Technol 2009, 43:5290–5294.
286. Williams J. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.matsceng.ohio-state.edu/fac_res/faculty/williams/index.htmlx, дата обращения 18.07.2015.
287. Withers J.C., Loutfy R.O., Lowe T.P. // Fullerenes Sci. Technol. - 1997. – Vol. 5. – № 1/ – P. 1–31.
288. Yang S.-T., Luo J., Zhou Q., Wang H. Pharmacokinetics, Metabolism and Toxicity of Carbon Nanotubes for Biomedical Purposes // Theranostics. - 2012. - 2(3):271-282. doi:10.7150/thno.3618.

289. Yang S.T., Wang X., Jia G., Gu Y., Wang T., Nie H., Liu Y. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice // *Toxicology letters*. – 2008. – 181(3), 182-189.
290. Yngersoll C.G., Dwyer F.J., May F.W. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990. – 9:9, 1171–1181.
291. Zhao X., Liu R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels // *Environment International*. – 2012. – Vol. 40, P. 244–255.
292. Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian S. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna* // *Journal of Nanoparticles Research*. – 2009. – V.11. – P.67–75.
293. Ziegler K.J., Gu Z., Peng H., Flor E.L., Hauge R.H., Smalley R.E. Controlled oxidative cutting of single-walled carbon nanotubes // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – 127(5), 1541-1547.