

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гусева Александра Анатольевича «Экотоксикологические характеристики высокодисперсного кристаллического углерода», представленную в диссертационный совет Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биологические науки)

Диссертационная работа Гусева А.А. изложена на 239 страницах, состоит из введения, 8 глав, заключения, списка используемых источников, включающего 293 наименования, в том числе 174 иностранных, содержит 18 таблиц и 62 рисунка.

Автореферат диссертации состоит из 39 страниц, включает 8 таблиц и 14 рисунков, отражает основное содержание проведенных научных исследований, представленных в диссертационной работе.

Во введении дано обоснование актуальности работы, сформулированы цели и задачи исследований, научная новизна, их практическая и теоретическая значимость, сформулированы выносимые на защиту положения, представлены данные о структуре диссертации, об апробации работы и о публикациях по теме исследований.

Актуальность работы. В результате процессов горения в окружающую среду ежегодно поступает до 150 млн. тонн микро- и нанодисперсных продуктов неполного сгорания органических соединений, включая углерод в виде аллотропных модификаций, таких как сажа, углеродные нанотрубки (УНТ), фуллерены. Многостенные УНТ (МУНТ) наиболее распространены в природе. Они способны сохраняться и накапливаться в окружающей среде, проникать и аккумулироваться в живых организмах, что может иметь негативные последствия для здоровья человека.

Экологические эффекты УНТ к настоящему времени мало изучены. Это связано с относительно недавним их открытием и сложностью выделения для исследования в чистом виде из природных продуктов. Нерешенной проблемой экотоксикологической оценки УНТ является создание алгоритмов их комплексных исследований, выявление ключевых тест-объектов и тест-функций, формирование основ для разработки нормативов по экологической безопасности. Опубликованные данные по экотоксикологии УНТ разрознены, часто противоречивы. Поэтому диссертационная работа Гусева А.А., посвященная исследованию 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, является актуальной и не вызывает сомнений.

Цели и задачи исследований сформулированы грамотно и вытекают из проблематики исследований, представленных в диссертационной работе.

Научная новизна, практическая и теоретическая значимость не вызывают сомнений, подтверждены получением российских и зарубежных грантов на проведение научных исследований по данной тематике, а также объектами интеллектуальной собственности.

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 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* и биосенсоре «Эколом» (*Escherichia 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 *Chironomus riparius* и ракообразные *Ceriodaphnia affinis*. Установлена безопасная концентрация НМ в водной среде, составляющая 2 мг/л для микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*. На политенных хромосомах *Chironomus riparius* обнаружен выраженный цитогенетический эффект МУНТ. Впервые установлен факт биоаккумуляции МУНТ в тканях растений на примере *Onobrychis 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 являются экспрессными и доступными широкому кругу исследователей, что обуславливает практическую значимость работы.

Положения, выносимые на защиту, являются обоснованными.

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

2. Применение методов экологического контроля по отношению к МУНТ должно дополняться изучением реакций организмов различных эколого-функциональных групп на молекулярно-клеточном и органно-тканевом уровне вследствие установленного наличия эффектов

биоаккумуляции, «малых доз», а также изменения активности ферментных систем и цитогенетического аппарата тест-объектов под воздействием МУНТ.

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

4. Рекомендуются следующие 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. На примере МУНТ показано, что использованные научно-методические подходы применимы для экологического анализа воздействия на биообъекты различных аллотропных модификаций нанокристаллического углерода, таких как одностенные УНТ (ОУНТ), фуллерены, графены.

Апробация работы и публикации по теме исследований. Результаты научных исследований обсуждались на научных конференциях различного уровня, опубликованы в 39 научных журналах, в том числе в 30 журналах, рекомендованных списком ВАК.

В первой главе «Современное состояние исследований, методической и нормативно-правовой базы в области безопасности углеродных наноматериалов» автором проведен анализ современного состояния изученности по тематике исследований, в том числе имеющихся методик и результатов оценки токсичности различных наноматериалов (НМ), включая углеродный НМ (УНМ). Установлена недостаточная освещенность научных исследований об экологическом воздействии наноразмерных частиц на фоне активного развития нормативно-методической базы для оценки безопасности НМ. Проведен сопоставительный анализ опубликованных данных, результат которых указывает на повышенную токсичность НМ по сравнению с химическими аналогами. Представлены различные концепции, объясняющие механизмы токсического действия наноструктурных материалов на биологические объекты.

Во второй главе «Материалы и методы исследований» приведены объекты (МУНТ и биологические объекты) и методики, использованные при исследованиях. Выбор биологических объектов обоснован, представлен их широкий спектр от бактерий до высших растений и животных. Выбор методик основан широким их применением в практике научных исследований. Использованы современные приборы и оборудование для проведения физико-химических исследований и анализа, что наряду со статической обработкой подтверждает надежность полученных автором результатов.

В третьей главе «Анализ содержания в средах и моделирование процесса перехода МУНТ в биодоступную форму» представлены результаты исследований микроструктуры исходных образцов методом микроскопии, позволившие идентифицировать их как МУНТ. На основании данных были выбраны 2 образца для дальнейших исследований, показана возможность

загрязнения ими окружающей среды. Применение ультразвукового диспергирования водных суспензий УНТ позволило установить, что максимально легко диспергируются УНТ с меньшим диаметром и большей удельной поверхностью. Наиболее стабильные водные суспензии образуют образцы МУНТ-2 и Сажа-2, на основании чего они были выбраны для проведения биологических экспериментов. Ультразвуковое диспергирование позволяет получать однородные суспензии с максимальным размельчением и распределением в растворе взвешенных частиц. Этот способ создания модельных сред был успешно применен автором для получения наночастиц различных соединений.

В четвертой главе «Определение степени потенциальной опасности МУНТ методом концептуального моделирования» для получения предварительного заключения о степени потенциальной опасности МУНТ были использованы основные критерии из методики, рекомендованной Роспотребнадзором РФ. По результатам расчетов величин частных опасностей, проведенных на основании объединенных данных о потенциальной опасности МУНТ в составе функциональных блоков модели, установлено, что НМ обладают высокой степенью опасности. Результаты моделирования указали на необходимость проведения полного комплекса исследований безопасности изучаемого материала.

В пятой главе «Оценка влияния МУНТ на бактерии и гидробионты» представлены результаты воздействия МУНТ на эффективность процессов биодеструкции и функционирования водных экосистем, исследованных путем биотестирования НМ с использованием распространенных в экотоксикологии экспресс-методик и объектов. Установлен негативный эффект по отношению к бактериям *Escherichia coli* и *Bacillus cereus*, начиная с концентрации 1 мг/л. Дальнейшее нелинейное изменение токсичности МУНТ, достигающее максимума при концентрации 1 г/л, не позволила автору определить полуметальные и безопасные концентрации для данных бактерий. На тест-системе «Эколюм» (*Escherichia coli* M-17) на объектах *Ceriodaphnia affinis*, *Scenedesmus quadricauda* и *Chironomus riparius* получены линейные зависимости «доза-эффект», позволившие отнести МУНТ к умеренно-опасным веществам.

Полученные экспериментальные данные не подтвердили результаты концептуального моделирования, предложенные автором и описанные в главе 4, хотя итоги цитогенетических исследований указывают на возможные отдаленные эффекты, связанные с нарушениями морфологии хромосом *Chironomus riparius*. Автором выявлено увеличение активности ядрышкового организатора политенных хромосом клеток личинок хирономид под действием МУНТ, что сопряжено с включением краткосрочных механизмов клеточной гиперкомпенсации для восстановления гомеостаза соматических клеток. Реакция *Chironomus riparius* на субклеточном уровне является более чувствительной по сравнению с реакцией на организменном уровне. По результатам теста на выживаемость данный тест-объект оказался наиболее резистентным к действию МУНТ.

На основании результатов исследований автор делает заключение, что использованные методы применимы для проведения экологической экспресс-оценки УНМ, за исключением тестов на бактериях *Escherichia coli* и *Bacillus cereus*, показавших нелинейные концентрационные эффекты, и теста на выживаемость *Chironomus riparius*, проявившего низкую чувствительность.

Шестая глава посвящена оценке способности МУНТ к биоаккумуляции в тканях растений и изучению сопутствующих морфофизиологических и биохимических эффектов. Показано, что корни, стебли и листья проростков *Onobrychis arenaria* в присутствии МУНТ приобретали темно-серый цвет за счет локализации в них конгломератов. Способность растений накапливать МУНТ указывает на его высокую потенциальную опасность, и подтверждает результаты моделирования, представленные в главе 4.

Отмечено подавление НМ процессов прорастания семян *Onobrychis arenaria*, а у проросших растений выявлено усиление роста корней, что можно объяснить увеличением поступления воды вследствие «пронзания» кожицы семян УНТ. При этом действие МУНТ на растения не линейно связано с концентрацией и отличается от действия сажи.

МУНТ меняют антиоксидантную активность проростков *Onobrychis arenaria*. Отмечено снижение активности каталазы практически при всех концентрациях НМ, при этом самую низкую активность фермента выявили при минимальной и максимальной концентрации МУНТ. Показатели активности пероксидазы в проростках эспарцета под действием МУНТ достоверно не отличались от контрольных значений. Накопление растениями МУНТ снижает активность полифенолоксидазы в большинстве экспериментов, что может свидетельствовать о возникновении под действием НЧ окислительного стресса, который рассматривается в качестве возможного механизма их токсичности.

Аккумуляция МУНТ *Onobrychis arenaria* оказывают ингибирующее действие на фотосинтетическую систему, приводя к снижению содержания хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов в большинстве случаев, что сопряжено с изменениями всхожести и активности антиоксидантных ферментов, и зафиксировано в группах «МУНТ 10 мг/л» и «МУНТ 10 г/л».

Установлено, что наличие МУНТ в среде прорастания семян оказывает значительный эффект на состояние гормонального баланса проростков *Onobrychis arenaria*. С увеличением концентрации МУНТ в тестируемой среде, увеличивается концентрация индолилуксусной кислоты и снижается уровень накопления цитокининов. Максимальная концентрация гиббереллинов отмечена при 1 г/л МУНТ, а при 10 г/л она почти в 2 раза ниже контроля. Выявлен повышенный уровень абсцизовой кислоты, свидетельствующий об угнетающем действии НМ, что может быть сопряжено с изменением восприимчивости рецепторов фитогормонов. 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.

В седьмой главе «Анализ патофизиологических, гистологических и репродуктивных эффектов МУНТ на лабораторных мышах» приведены данные о воздействии МУНТ на мышей, являющихся важным компонентом системы оценки экологической безопасности данного материала.

Результаты экспериментов не выявили летальных случаев для животных. Отклонений в общем состоянии животных не отмечено, за исключением незначительных нарушений двигательной активности экспериментальных особей, получавших МУНТ в дозе 30 мг/кг в подостром эксперименте. В группах животных, экспонированных МУНТ в дозах 0,3 и 3 мг/кг, достоверных отличий в изменении массы тела не выявили. Минимальные значения данного показателя зафиксированы в группе «МУНТ 3 мг/кг» и в группе, получавшей сажу, максимальные значения – в группе «МУНТ 30 мг/кг».

Автором установлено, что среднесуточная дозировка 30 мг/кг МУНТ приводит к гипотрофии печени мышей, а сажа подобных эффектов не вызывает. Выявлено негативное дозозависимое воздействие МУНТ на структуру печени, почек и лёгких, приводящее к нарушению кровообращения вплоть до кровоизлияний, появлению многочисленных лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов, активизации макрофагальной системы мышей. Оценка репродуктивной токсичности показала, что происходят изменения в тканях печени, свидетельствующие о возможности восстановления тканей после прекращения экспозиции МУНТ. Цитогистологический анализ семенников с расчетом индекса сперматогенеза отклонений у животных экспериментальных групп не выявил.

Снижение уровня кортикостерона в плазме крови самцов мышей свидетельствует о выраженной адаптивной реакции, что может быть обусловлено или постепенным истощением стресс-реализующей системы организма под действием МУНТ, или изменением метаболизма стероидов. Оценка оплодотворяющей способности мышей на основании результатов расчета индекса I показала дозозависимый угнетающий эффект во всех экспериментальных группах. В группе «сажа» по сравнению с МУНТ исследуемый показатель снизился значительно меньше, что свидетельствует о более высокой репродуктивной токсичности последнего.

Таким образом, автором показано, что печень, почки и лёгкие являются наиболее вероятными органами-мишенями для наночастиц МУНТ, а хроническая инфильтрация паренхимы МУНТ в этих органах может приводить к различным патологическим изменениям. Нарушение гормонального баланса и уменьшение значения индекса оплодотворяющей способности самцов свидетельствуют о наличии репродуктивной токсичности, что согласуется с представлениями об индуцировании НМ окислительного стресса, который обуславливается активными формами

кислорода, способными провоцировать воспалительные, генотоксические и цитотоксические последствия. На примере лабораторных мышей показано, что исследуемый НМ представляет опасность при попадании в желудочно-кишечный тракт млекопитающих, поскольку в субхроническом исследовании отмечены дозозависимые эффекты, включая изменение массы тела, нарушение гормонального статуса, уменьшение индекса оплодотворяющей способности и повреждающее воздействие на печень, почки и легкие. Значительные нарушения структуры тканей, функционирования эндокринной системы и выраженная репродуктивная токсичность, подтверждают результаты моделирования, представленного автором в главе 4, и характеризуют уровень экологической опасности исследуемых МУНТ как «высокий». Используемые в разделе методы исследования показали достаточную чувствительность и избирательность, что делает целесообразным их дальнейшее использование при проведении экологической оценки УНМ.

Восьмая глава посвящена разработке подходов для создания экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты. Автором определены параметры экологической безопасности ранее не исследованного фактора природно-техногенного происхождения. Разработаны предложения по нормам безопасного поступления МУНТ, составляющие для водной среды не более 2 мг/л, а для организма млекопитающих (суточная дозировка, перорально) – не выше 0,3 мг/кг. Автором выявлены различия в экотоксическом действии, связанные с особенностями структуры молекул и молекулярных комплексов при одинаковом химическом составе углеродных НМ на примере МУНТ и сажи. Для экологической оценки наноструктурного кристаллического углерода (ОУНТ, МУНТ, фуллерены, графеноподобные материалы) рекомендуется применять предлагаемые автором исследовательские алгоритмы, включая проведение идентификации, оценки содержания в средах и пробоподготовки, концептуальное моделирование опасности НМ, использование исследованных в работе тест-объектов и тест-функций.

В главе **«Заключение»** автором представлены основные выводы по результатам диссертационных исследований. Выводы являются обоснованными, коррелируют с целями и задачами исследований.

Диссертационную работу завершает **список использованных источников**, полностью совпадающий со ссылками в тексте диссертации.

Диссертационная работа написана грамотным научным языком, в ней продемонстрированы достоинства научных исследований автора. Однако по ней можно сделать ряд **замечаний**.

1) Большой по размеру литературный обзор, занимает 82 страницы (34% от объема всей диссертационной работы, включая список литературы).

2) Имеется ряд опечаток и неточностей в оформлении. Например, на стр. 102 дано наименование подраздела, а сам подраздел начинается на стр. 103; подраздел 2.2.10.2 начинается с новой страницы и пр. В автореферате рисунок 7 представлен дважды.

3) По номенклатурным правилам биологических объектов курсивом пишут только родовое название и видовой эпитет. Все остальные названия, включая наименование семейств и отрядов, пишутся не курсивом. У автора в диссертации названия семейств и отряда написаны курсивом.

4) Для определения фотосинтетических пигментов дополнительно проводят измерения при длине волны 720 нм, величина оптической плотности которой указывает на погрешность самого растворителя (в данном случае ацетона), и учитывается при введении данных в формулу для вычисления концентрации хлорофиллов и каротиноидов: $D = D_{\text{пигмента}} - D_{720}$. В методике, приведенной автором на стр. 119, этот показатель отсутствует.

5) После идентификации исходных образцов как МУНТ для дальнейших исследований автор выбрал из восьми только два, образующие наиболее стабильные водные суспензии (глава 3, стр. 130). Почему не был использован хотя бы 1 образец с меньшей стабильностью водных суспензий?

6) На рис. 27 и 28 (стр. 141 и 142) представлены данные зависимости интенсивности рассеивания от размера агломератов и частиц УНТ и сажи. Практически в каждом графике имеются кривые, обозначенные разным цветом. Остается непонятным, что они обозначают.

7) На стр. 159 (последний абзац) автор пишет: «... максимальная рефлексия установлена для бактерий и водорослей ...». Что автор имел ввиду под рефлексией бактерий и водорослей?

8) Шестая глава «Оценка способности МУНТ к биоаккумуляции в тканях растений и сопутствующие морфофизиологические и биохимические эффекты» названа некорректно. Ткани растений накапливают МУНТ, что приводит к изменениям морфофизиологических и биохимических процессов, т.е. способностью к аккумуляции обладает растение, причем в данном случае конкретный рассматриваемый вид. Вследствие своих особенностей каждый вид высшего растения будет обладать различной способностью накапливать МУНТ, что в той или иной степени будет или не будет влиять на их морфогенез и продуктивность. Исходя из этого, аккумуляция растениями одного и того же МУНТ всегда будет различна, и она будет определяться видом растения. Способность аккумулировать конкретное соединение всегда есть величина постоянная при определенных (одинаковых) условиях, т.е. каждый вид растения при определенных условиях может аккумулировать МУНТ максимум в таком-то количестве. Накапливаемое вещество, в данном случае МУНТ, не обладает способностью накапливаться.

9) На рисунке 7 автореферата и рисунке 40 диссертации представлены данные по содержанию фотосинтетических пигментов в проростках *Onobrychis arenaria*. Автор этим показывает изменение окислительно-восстановительного гомеостаза в растениях под воздействием МУНТ, что оправдано. Однако содержание пигментов представлено в мг/л, что является некорректным и отражено не на оси ординат. Для корректного анализа и обсуждения результатов необходим пересчет данных в мг на массу или площадь исследуемого образца в зависимости от применяемой методики. В методике, приведенной автором в главе 2, для определения содержания

пигментов брали навеску растительного материала массой 0,1 г., т.е. пересчет должен был быть сделан на массу. Из представленных в диссертации данных также остается неясным, использовали для определения содержания пигментов только зеленую массу проростков или весь проросток, а также какого возраста были проростки (5 или 10 суток), что существенно может влиять на конечный результат.

10) Глава 8 «Разработка подходов для создания экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты» является в большей степени заключением по результатам работы, а не представлением новых данным.

11) В тексте диссертации при обсуждении результатов исследований не приводятся ссылки на публикации автора, в которых он представил эти данные научному сообществу.

Заключение о соответствии диссертационной работы требованиям «Положения ВАК»

Представленные выше замечания не снижают научной ценности диссертационной работы, не затрагивают новизну, теоретическую и практическую значимости, не ставят под сомнение обоснованность выводов.

Диссертационная работа является законченным научным исследованием, изложена грамотным научным языком, логически выстроена. Достоверность полученных автором результатов и обоснованность выводов подтверждается использованием современных физико-химических методов исследований.

Диссертационная работа Гусева Александра Анатольевича «Экотоксикологические характеристики высокодисперсного кристаллического углерода» соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Декан биолого-химического факультета, заведующий кафедрой биологии растений и биохимии ФГБОУ ВО «Томский государственный педагогический университет», доктор биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биологические науки), профессор



Минич Александр Сергеевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Томский государственный педагогический университет», 634061, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 60, Телефон: (3822) 52-17-54, e-mail: rector@tspu.edu.ru, официальный сайт: <http://www.tspu.edu.ru>



29 декабря 2016 года