

## ОТЗЫВ

официального оппонента

д.м.н., профессора Соседовой Ларисы Михайловны на диссертационную работу Гусева Александра Анатольевича «**Экотоксикологические характеристики высокодисперсного кристаллического углерода**», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биологические науки)

### **Актуальность проблемы диссертационного исследования.**

Одной из приоритетных проблем отечественной биологии является изучение экологической безопасности для окружающей природной среды и человека, связанной с развитием нанотехнологий и распространением поллютантов, имеющих наноструктурные характеристики. Отмечается экспоненциальный рост числа публикаций, демонстрирующих негативные эффекты наночастиц (НЧ) с характерным размером менее 100 нм, при этом существенная часть нанотоксикологических исследований посвящена углеродным нанотрубкам (УНТ), способным сохраняться и накапливаться в окружающей среде, проникать и аккумулироваться в живых организмах. Тем не менее, несмотря на многочисленные исследования по различным аспектам воздействия УНТ на растительные и животные организмы, а также культуры *in vitro*, в настоящее время недостаточно информации по изучению особенностей их экологических эффектов.

Исходя из возможности негативного воздействия УНТ становится понятно, что при исследовании их экотоксикологической безопасности важно оценить используемые для подобных исследований материалы и методы. Появившиеся с развитием нанотехнологий в последние десятилетия и получившие широкую распространенность методы, основаны на приоритете количественного анализа содержания химических элементов и соединений в природных и техногенных средах. Вместе с тем трудно переоценить значимость размерности НЧ, пространственной организации макромолекул и молекулярных комплексов при неизменном химическом составе, т.е. вклада наноструктуры поллютантов для проявления экотоксикологических свойств. Поэтому существует необходимость в разработке подходов для оценки биобезопасности и создания экологически обоснованных норм воздействия УНТ и, в частности многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) на биообъекты.

Применение апробированных автором исследовательских алгоритмов, включая проведение идентификации, оценки содержания в средах и пробоподготовки, концептуальное моделирование опасности НМ,

использование определенных в работе тест-объектов и тест-функций имеет большое значение для первичного исследования экологической безопасности нанодисперсных продуктов неполного сгорания углеродосодержащих материалов. Использование автором комплекса биологических, микробиологических, экотоксикологических, биохимических, инструментальных (в том числе современных электронно-микроскопических методик, спектрометрических с использованием сканирующей системы-классификатора мобильных частиц SMPS) и статистических методов исследования с целью изучения влияния МУНТ на представителей различных эколого-функциональных групп для формирования методических рекомендаций по установлению пределов толерантности и оценке устойчивости организмов к данному фактору, свидетельствует о высоком методическом уровне работы и подчеркивает ее актуальность.

**Научная новизна и теоретическая значимость диссертационной работы** заключаются в научном обосновании методологии экологической оценки МУНТ, включающей изучение реакций организмов различных эколого-функциональных групп на молекулярно-клеточном и органно-тканевом уровне с разработкой экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты; в обоснование патогенетических механизмов воздействия МУНТ на организмы различных эколого-функциональных групп, согласно которым ответная реакция обусловлена наличием эффектов биоаккумуляции, «малых доз», а также изменением активности ферментных систем и цитогенетического аппарата тест-объектов и тест-функции организмов.

В 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. Проведёнными исследованиями доказано, что использование концептуального экологического моделирования позволяет выявить потенциальные угрозы со стороны наноструктурных поллютантов при первичной оценке экологической безопасности МУНТ. Впервые разработана и проведена комплексная оценка эколого-биологических эффектов МУНТ с использованием представителей различных эколого-функциональных групп организмов. Полученные результаты позволили доказать бактерицидное действие исследуемого УНМ на тест-объектах *E. coli*, *B. cereus* и биосенсоре «Эколюм» (*E. coli* M-17); выявить, что наиболее устойчивым к изучаемому

фактору из исследованных бактерий и гидробионтов являются личинки насекомых *Ch. riparius* и ракообразные *C. affinis*. Отмечены особенности воздействия МУНТ на организм лабораторных мышей в проявлении гепатотоксического, нефротоксического, пневмотоксического эффектов, а также репродуктивной токсичности при субхроническом пероральном введении коллоидного водного раствора.

Впервые на основании проведенных экспериментальных исследований рекомендованы ориентировочные пороговые значения, при которых концентрация МУНТ в водной среде не должна превышать 2 мг/л, среднесуточная дозировка при пероральном поступлении млекопитающим – не более 0,3 мг/кг.

Безусловным достоинством диссертационной работы является впервые проведенное сопоставление данных, полученных экспериментальным путем с результатами концептуального моделирования, подтверждающее достоверность теоретического анализа.

Практическая значимость результатов исследований выразилась в разработке четырех объектов интеллектуальной собственности, двух учебно-методических пособий, используемых в учебном процессе в ТГУ имени Г.Р. Державина и внедренных в производство рекомендаций, исключающих попадание МУНТ на слизистые оболочки персонала, задействованного при исследовании, производстве, хранении, транспортировке и утилизации УНМ.

Приоритет автора в исследованиях по данным вопросам экологии подтверждается 49 публикациями, в том числе 21 – в изданиях, включенных в Перечень российских рецензируемых ВАК научных журналов для публикаций материалов диссертаций, 9 – в международных англоязычных журналах, а также публикацией 2 учебно-методическими пособий.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений, сформулированных в диссертации** не вызывает сомнений и определяется высоким научно-методическим уровнем диссертационного исследования А.А. Гусева, широким уровнем апробации и публикации результатов исследования на Всероссийских (в том числе с международным участием) и международных научно-практических конференциях, съездах и конгрессах по нанотоксикологии, биологии.

Задачи исследования определены конкретно, сформулированы четко, отражают основные этапы исследования, отвечают поставленной цели.

На первом этапе работы методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии исследуемый материал был идентифицирован как

МУНТ, описаны его важнейшие структурные характеристики; успешно апробирован способ создания модельных сред. На втором этапе исследований проведено определение степени потенциальной опасности МУНТ методом концептуального моделирования, с использованием методики, рекомендованной Роспотребнадзором РФ (Методические рекомендации..., 2009). На третьем этапе были выявлены закономерности морфофизиологических реакций организмов различных эколого-функциональных групп на воздействие коллоидных водных растворов МУНТ; определены характеристики острого и подострого воздействия МУНТ на лабораторных мышей.

Располагая значительным фактическим материалом для разрешения поставленных цели и задач, автором проведен многосторонний анализ полученных результатов исследования.

Таким образом, обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов основывается на обследовании достаточного количества биологических объектов, тщательности формирования групп, использовании высокоинформативных современных экотоксикологических, микробиологических, биохимических и инструментальных методов исследования, подробном анализе и сопоставлении данных экспериментальных исследований с результатами теоретического моделирования, корректной статистической обработке. Научные положения, выносимые на защиту, и выводы исходят из содержания работы и результаты исследования их подтверждают.

**Структура и объем диссертации.** Работа написана в классическом стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, восьми глав собственных исследований, заключения, содержащего выводы и списка литературы. Диссертация изложена на 238 страницах, наглядно иллюстрирована 18 таблицами и 62 рисунками. Список литературы включает 293 источника, в том числе 174 на иностранных языках (последние источники литературы датированы 2015 годом).

Введение отвечает предъявляемым требованиям, содержит все необходимые разделы: кратко обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту.

Аналитический обзор литературы изложен достаточно полно и охватывает современные аспекты изучаемой проблемы: современное понятие нанотехнологий и наноматериалов; характеристику безопасности углеродных наночастиц как часть проблемы безопасности наноматериалов;

вопросы миграции наночастиц в окружающей среде и экологические эффекты; влияние наночастиц на растительные организмы и млекопитающих; нормативно-правовое регулирование в сфере безопасности нанотехнологий.

В обзоре представлены точки зрения и суждения различных авторов, грамотно используется современная литература, что свидетельствует об эрудиции автора и его способности к аналитической работе. Знание литературы позволило автору сформулировать цель и задачи собственного диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы обследования» диссертант предлагает дизайн исследования, описывает используемые в работе методы исследований, способы оценки воздействия многостенных углеродных нанотрубок на группы организмов различных эколого-функциональных групп, а также представляет принципы концептуального моделирования уровня потенциальной опасности наноматериала на основе использования генеральных определительных таблиц, представляющих собой перечень признаков НМ, сгруппированных по функциональным блокам, и упорядоченных по значимости. Выбор исследовательских методик адекватен для решения поставленных цели и задач диссертационной работы. Определив ее цель, в главах результатов собственных исследований автор последовательно описывает полученные в процессе работы данные, проводит их сравнительный анализ и сопоставления, делает обоснованные заключения.

В главе 3 «Анализ содержания в средах и моделирование процесса перехода многостенных углеродных нанотрубок в биодоступную форму» проанализированы загрязненность воздуха производственных помещений МУНТ, определен фракционный состав наночастиц, разработаны методы гомогенизации исследуемого материала с целью достижения максимальной степени разбиения агломератов НЧ и получения стабильных суспензий с использованием двух принципов диспергирования: высокоинтенсивных кавитационных воздействий; и механических воздействий. Апробация различных методов пробоподготовки выявила наибольшую эффективность при создании стабильных коллоидных систем комплексного подхода, включающего методы оценки размера,  $\zeta$ -потенциала НЧ и ультразвукового диспергирования. Показана наибольшая эффективность диспергирования углеродных НЧ в дисперсионной среде с использованием высокоинтенсивных кавитационных воздействий. Установлено, что в водных суспензиях наиболее легко диспергируются углеродные нанотрубки с меньшим диаметром и большей удельной поверхностью. Выявлено, что в

результате применения ультразвукового подхода к гомогенизации максимумы распределения взвешенных частиц лежат в субмикронном и нанометровом диапазонах.

Глава 4 содержит результаты определения степени потенциальной опасности многостенных углеродных нанотрубок методом концептуального моделирования. Информация об особенностях НЧ, содержащаяся в открытых источниках, классифицировалась, систематизировалась и анализировалась в последовательных функциональных блоках в соответствии со значимостью той или иной характеристики. Проанализированы 25 признаков в шести функциональных блоках, отражающих важнейшие характеристики НЧ.

Приведены формулы, по которым оценивалась степень опасности МУНТ и значения показателя опасности. После объединения данных о потенциальной опасности МУНТ в составе функциональных блоков модели был проведен расчет величин частных опасностей, позволивший заключить, что МУНТ обладают высокой степенью опасности и данная оценка достоверна.

В главе 5 «Оценка влияния многостенных углеродных нанотрубок на бактерии и гидробионты» проведено биотестирование наноматериала с использованием представляющих различные эколого-функциональные группы тест-объектов – бактерии, ракообразные, членистоногие и микроводоросли. Результатом исследования явилось определение класса опасности МУНТ по кратности разведения водной вытяжки, при которой не выявлено воздействие на тест-объекты. Выполненный, согласно результатам биотестирования на бактериях и гидробионтах анализ, позволил диссертанту сделать заключение о принадлежности МУНТ к умеренно опасным веществам. 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.

В главе 6 «Оценка способности многостенных углеродных нанотрубок к биоаккумуляции в тканях растений и сопутствующие морфофизиологические и биохимические эффекты» представлены результаты изучения влияния МУНТ на показатели всхожести и морфометрические параметры эспарцета песчаного, результаты анализа микроскопического и биохимического статуса растений. Автором убедительно показано проникновение МУНТ в ткани вегетативных органов *O. arenaria* при концентрации 100 и 1000 мг/л, отмечена повышенная

биоаккумуляция МУНТ в районе устьиц, выявлена активизация антиоксидантной и фитогормональной систем, подавление процессов прорастания семян (в концентрациях 1 мг/л – 10 г/л), стимуляция нарастания стеблей и корней. На основании выявленных достоверных изменений энергии прорастания, всхожести, морфометрических характеристик, активности ферментов антиоксидантной системы и фитогормонов, а также содержания растительных пигментов, начиная с самых низких концентраций МУНТ, А.А. Гусев считает данные параметры перспективными для использования в экологической оценке УНМ.

В главе 7 проведен анализ патофизиологических, гистологических и репродуктивных эффектов МУНТ на лабораторных мышах. Выявлено, что МУНТ в среднесуточных дозировках 0,3 – 30 мг/кг при пероральном поступлении не вызывает повышения уровня летальности мышей. В то же время автором показано, что исследуемый нанопрепарат представляет опасность при попадании в желудочно-кишечный тракт млекопитающих; отмечены дозозависимые эффекты действия МУНТ, нарушения гормонального статуса, уменьшение индекса оплодотворяющей способности и повреждающее воздействие на печень, почки и легкие. Сделан вывод, что значительные нарушения структуры тканей, функционирования эндокринной системы и выраженная репродуктивная токсичность, подтверждают результаты проведенного моделирования и характеризуют уровень экологической опасности исследуемых МУНТ как «высокий».

В целом, выявленные закономерности морфофизиологических реакций организмов различных эколого-функциональных групп, определяют ведущую идею данного исследования – экологическая оценка толерантности различных организмов к воздействию МУНТ биохимическими, цитогенетическими, цитологическими, гистологическими и токсикологическими методами на примере исследованных биообъектов выявила тенденцию к уменьшению биоповреждений в ряду одноклеточные сапротрофы и фитопланктон (бактерии, микроводоросли) – зоопланктон (ракообразные, насекомые) – наземные автотрофы (высшие растения) – гетеротрофы-фитофаги (млекопитающие).

В главе 8 приведена разработка подходов для создания экологически обоснованных норм воздействия многостенных углеродных нанотрубок на биообъекты. Проведенные экспериментальные и теоретические исследования позволили диссертанту обосновать алгоритм оценки степени экологической опасности исследуемого материала, а также выявить экотоксикологические различия воздействия углеродных наноматериалов на примере МУНТ и сажи, обусловленные особенностями структуры молекул и

молекулярных комплексов при одинаковом химическом составе. Выраженный графически анализ применимости тест-объектов и тест-функций для разработки экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты несомненно будет полезен при проведении экологической оценки других наноразмерных продуктов неполного сгорания соединений углерода. В целом, обсуждение подходов для создания экологически обоснованных норм воздействия многостенных углеродных нанотрубок на биообъекты проведено на хорошем уровне с анализом полученных данных, что еще раз подтверждает эрудицию автора.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации.** Основные положения и выводы автореферата полностью отвечают поставленным задачам; достаточны, обоснованы, отражают научную новизну работы и имеют практическую направленность; являются логическим завершением проведенного диссертационного исследования.

**Результаты внедрения выполненных автором исследований.** Результаты диссертационной работы легли в основу разработки объектов интеллектуальной собственности: база данных «Биобезопасность наноматериалов», ноу-хау «Способ ультразвуковой обработки многокомпонентных смесей», «Способ приготовления водных суспензий высокодисперсных материалов с использованием ультразвуковой обработки», «Метод мониторинга концентрации аэрозольных частиц». Разработанные учебно-методический комплекс «Токсикологическое влияние наночастиц на здоровье млекопитающих» и учебное пособие «Безопасность наноматериалов» 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». Рекомендации по исключению попадания МУНТ на слизистые оболочки персонала, задействованного при исследовании, производстве, хранении, транспортировке и утилизации углеродных наноматериалов внедрены в производство. Все документы подтверждены соответствующими свидетельствами и актами внедрения.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Однако, в порядке дискуссии хотелось бы знать мнение автора по следующим вопросам:

1. Чем обусловлены различия в способности МУНТ аккумулироваться в растительных тканях и отсутствие таковой в тканях животных? В то время

как по данным литературы (Kolosnjaj-Tabi et al., 2010; Murphy et al., 2011; Kobayashi et al., 2010; Халиуллин Т.О., 2013) углеродные нанотрубки, в том числе и МУНТ способны к длительному депонированию в тканях лабораторных животных.

2. При статистической обработке результатов исследования учитывалась ли нормальность распределения полученных показателей? Статистически данные представлены в виде средней с ошибкой средней, однако при небольшом количестве вариаций (рис.49, стр.186; табл.17, стр.192; рис. 55,56, стр.193,194) обычно применяют непараметрические методы обработки результатов, так как чаще всего при таком количестве показателей распределение бывает ненормальным.

3. В выводе 5 автором в субхроническом исследовании отмечены дозозависимые эффекты действия МУНТ: нарушение гормонального статуса, уменьшение индекса оплодотворяющей способности и повреждающее воздействие на печень, почки и легкие, включая изменение массы тела. Вместе с тем на стр.185 в группе, получавшей «МУНТ 30 мг/кг» зафиксированы максимальные значения набора массы тела животных, являющейся, как известно интегральной характеристикой функционального состояния организма. В данной группе отмечены наиболее выраженные негативные изменения практически всех изучаемых показателей и, наряду с этим, наблюдалось повышение массы тела? Чем, по Вашему мнению, это обусловлено и можно ли в данном случае делать вывод о дозовой зависимости?

4. Чем обусловлено расположение на полу спектрометра-классификатора частиц FMPS модель 3091, анализирующего пробы воздуха в производственных помещениях объекта наноиндустрии и непромышленной (бытовой) зоне? Тогда как, согласно Руководству Р 2.2.2006-05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда отбор проб воздуха на содержание неблагоприятных производственных факторов» (2005) отбор проб воздуха должен проводиться в зоне дыхания, на уровне 1,5-х метров.

5. С чем, по Вашему мнению, связано высокое содержание концентрации МУНТ в воздухе непромышленного помещения на территории НОЦ «Нанотехнологии и наноматериалы» ТГУ им. Г.Р. Державина, являющегося контрольной территорией сравнения?

Высказанные замечания ни в коей мере не снижают научную и практическую значимость выполненной диссертационной работы.

## Заключение

Диссертационное исследование Гусева Александра Анатольевича «Экотоксикологические характеристики высокодисперсного кристаллического углерода», представленное на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности Экология (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, посвященной решению актуальной для экологии научной задачи, направленной на совершенствование экологически обоснованных норм воздействия МУНТ на биообъекты. По своей научной новизне, методическому решению цели и задач исследования, практической и теоретической значимости полученных результатов, степени обоснованности научных положений и выводов, представленная диссертационная работа А.А. Гусева соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология.

Официальный оппонент,  
ведущий научный сотрудник лаборатории  
биомоделирования и трансляционной  
медицины Федерального  
государственного бюджетного научного  
учреждения «Восточно-Сибирский институт  
медико-экологических исследований»,  
д.м.н., профессор

Л.М. Соседова

Подпись Л.М. Соседовой удостоверяю,

Ученый секретарь  
ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт  
медико-экологических исследований»  
к.б.н



Т.М. Гуськова