

УДК 57.043, 57.044

## ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЛЕКСНОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ УГЛЕРОДНОГО НАНОМАТЕРИАЛА – ПЕРСПЕКТИВНОГО НОСИТЕЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© А.А. Гусев, О.Н. Зайцева, И.А. Полякова, Е.Б. Горшенева, А.В. Емельянов,  
С.В. Шутова, С.В. Романцова, С.В. Семилетова, А.Г. Ткачев, Н.Е. Пиляшенко

*Ключевые слова:* биотестирование; многостенные углеродные нанотрубки; биобезопасность; ксенобиотики; репродуктивная токсичность.

Представлены результаты комплексного исследования влияния промышленно производимого углеродного наноструктурного материала (многостенных углеродных нанотрубок) на различные тест-объекты – бактерии, микроскопические гидробионты, высшие растения, млекопитающие. Установлено, что в больших дозировках наноматериал проявляет выраженное токсическое действие, которое в зависимости от природы тест-объектов выражается в повышении уровня летальности, подавлении репродуктивной деятельности. В то же время, в малых дозировках наноматериал может стимулировать процессы роста и развития, позитивно влиять на показатели репродукции.

Углеродные нанотрубки, открытые в 1991 г., быстро завоевали статус одного из самых перспективных материалов будущего. Для исследования был выбран углеродный наноструктурный материал «Таунит» (УНМ «Таунит»), представляющий собой одномерные, наномасштабные, нитевидные образования поликристаллического графита цилиндрической формы с внутренним каналом, в виде сыпучего порошка черного цвета. Гидрофобен химически инертен, чистота – более 98 %. Гранулы УНМ микрометрических размеров имеют структуру спутанных пучков многостенных трубок, способ получения – газозольное химическое осаждение на металлическом катализаторе (ГФХО) или CDC-процесс. «Таунит» является перспективным материалом для авиационной, атомной, космической промышленности, медицины, фармацевтики, для производства суперкомпьютеров, видеотехники, плоских экранов, мониторов, фильтров широкого назначения. Добавка УНМ «Таунит» улучшает качество смазок, конструкционных композитов, строительных материалов. Гранулы «Таунита» могут служить носителями катализаторов или лекарственных препаратов, а также в качестве адсорбентов, источников холодной эмиссии электронов. Необходимым условием успешного внедрения УНМ «Таунит» является комплексное биотестирование на живых объектах различных систематических групп [1, 2].

На первом этапе исследований были выбраны пространственные в экотоксикологической практике тест-объекты: культура зеленых протоккокковых водорослей (*Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Vrebbison, 1835), цериодафнии (*Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900) и тест-система «Эколюм» – культура люминесцентных генноинженерных бактерий (*Escherichia coli* M-17, 1885).

Следующий этап комплексных исследований – биотестирование углеродного наноматериала «Таунит» на высших растениях. В качестве модельных объектов

были выбраны сельскохозяйственные культуры: яровая пшеница, горох и подсолнечник. На выбор объектов исследования повлиял тот факт, что нанотрубки являются перспективными носителями удобрений для сельскохозяйственных растений [3], способных повлиять на решение остро стоящей перед человечеством продовольственной проблемы [4].

Еще одним направлением исследований стала оценка реакции репродуктивной системы млекопитающих (лабораторных мышей) на углеродный наноструктурный материал «Таунит» (УНМ «Таунит», многослойные углеродные нанотрубки), вводимый перорально.

Во всех экспериментах использовался коллоидный водный раствор тестируемого материала, который готовился на дистиллированной воде с использованием ультразвуковой установки.

Комплексные исследования тест-объектов проводились по следующим методикам.

1. Биотестирование с использованием бактерий и гидробионтов выполнялось на базе «Центра лабораторного анализа и технических измерений по Центральному федеральному округу» (г. Тамбов) в соответствии с методиками, внесенными в Государственный реестр методик количественного химического анализа и оценки состояния объектов окружающей среды, допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга: «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолоуминесценции тест-системой «Эколюм»; «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафнии»; «Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей».

2. Проводилось изучение влияния углеродных нанотрубок на ранние стадии онтогенеза растений, поскольку именно начальные этапы развития характеризуются наибольшей чувствительностью к внешним факторам. Для этого были заложены опыты по проращиванию семян в среде, представляющей собой 0,03 %-ный (по массе) коллоидный раствор УНМ «Таунит» в дистиллированной воде. Условия проращивания соответствовали требованиям методики (ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести). Для приготовления контрольной среды бралась чистая вода. Оценивались: всхожесть семян (%), энергия прорастания (%), линейные размеры и масса надземных и подземных частей растений. Эксперименты продолжались по 18 дней. Измерение активности форм пероксидазы клеточной стенки проводили по методу А.Н. Бояркина (1951) [5]. Присутствие наноматериала в тканях растений определяли с помощью метода световой микроскопии.

3. Проводились эксперименты согласно методическим рекомендациям по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека [6]. Эксперимент состоял из двух частей: в первом случае проводилась оценка физиологического эффекта исследуемого наноматериала на самцов, во втором – на самок лабораторной мыши.

Для исследования воздействия наноматериала на мужскую репродуктивную функцию формировались две одновозрастные группы животных (экспериментальная и контрольная группы), состоящие из 10 половозрелых нелинейных самцов лабораторной мыши каждая. На протяжении всего эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (ГОСТ Р 50258-92). Карантин составлял 10 дней. В течение 30 дней экспериментальной группе перорально вводился УНМ «Таунит» путем замены питьевой воды на коллоидный водный раствор. Среднесуточная доза исследуемого материала на каждого самца в экспериментальной группе составляла 30 мг/кг. Оценивалось общее состояние животных. Контрольную группу составляли мыши, которым вводили дистиллированную воду в аналогичных количествах. По истечении срока экспозиции к каждому самцу подсаживалось по 3 виргинных неэкспонированных самки. Отмечалось наличие полового поведения. Подсадка самок к подопытным самцам производилась еженедельно на протяжении трех недель. Отсаженных самок вскрывали через 15–17 дней. Оценивалось количество беременных самок, самок с живыми плодами, с мертвыми плодами; количество живых и мертвых плодов на помёт.

Для оценки действия наноматериала на репродуктивную функцию самок формировались две одновозрастные группы животных (экспериментальная и контрольная группы), состоящие из 10 половозрелых нелинейных самок лабораторной мыши каждая. На протяжении всего эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (ГОСТ Р 50258-92). Карантин составлял 10 дней. Коллоидный водный раствор наноматериала для поения животных готовился аналогично предыдущему. После нескольких дней совместного содержания с половозрелыми неэкспонированными самцами самок отсаживали в отдельные клетки и с этого момента переходили на поение тестируемой

жидкостью. Эксперимент завершался после окончания молочного вскармливания потомства. Оценивали следующие показатели: % гибели самок (общий и за каждый день эксперимента); % гибели молодняка в течение первых трех дней жизни; % не родивших самок; число эмбрионов у погибшей самки; плодовитость; общее состояние самок. На каждом этапе, помимо экспериментальной группы, содержалась и аналогичным образом изучалась контрольная группа мышей, для поения которой использовалась дистиллированная вода.

Проведенные исследования позволили получить следующие результаты.

1. Биотестирование УНМ «Таунит» на микроскопических биообъектах выявило, что, согласно принятой в экотоксикологии пятибалльной шкале, данный материал может быть отнесен к 3–4 классу опасности. При этом наибольшую резистентность проявили тест-объекты *Ceriodaphnia affinis*, а наименьшую – *Scenedesmus quadricauda* и *E. Coli*.

2. Коллоидный водный раствор УНМ «Таунит» в концентрации 0,3 мг/мл оказывает подавляющее действие на процессы раннего вегетативного онтогенеза пшеницы, гороха и подсолнечника, что выражается в снижении росто-весовых показателей и запаздывании развития по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем, отмечено позитивное влияние наноматериала на развитие корневой системы. Также зафиксирован положительный эффект УНМ «Таунит» на всхожесть семян и на защищенность их от гниения. Последнее может быть связано с подавляющим действием наноматериала на развитие микроорганизмов. Как показали предыдущие исследования, именно бактерии оказались наиболее чувствительными тест-объектами к воздействию нанотрубок. Примечательно, что тестируемый раствор имел концентрацию в пределах летальных значений содержания УНМ «Таунит», определенных для бактериальной флоры [7, 8].

3. На протяжении эксперимента по исследованию влияния УНМ «Таунит» на самцов лабораторной мыши общее состояние выживших тест-объектов можно считать удовлетворительным. Наблюдалось незначительное угнетение двигательной активности. Установлено, что УНМ «Таунит» в дозировке 150 мг/кг в 30 % случаев оказывает летальное действие на самцов лабораторной мыши. В дозировке 30 мг/кг летального эффекта не обнаружено. Патанатомический анализ погибших особей показал острое геморрагическое воспаление внутренних органов. У всех самцов как контрольной, так и экспериментальных групп отмечалось адекватное половое поведение. При оценке общей репродуктивной функции экспериментальных животных путем ссаживания с виргинными неэкспонированными самками обнаружили полную стерильность самцов. При вскрытии потенциально беременных самок ни у одной в рогах матки не было выявлено никаких признаков беременности, что свидетельствует о серьезном нарушении репродуктивной функции самцов под воздействием наноматериала.

Для исследования влияния наноматериала на женскую репродуктивную функцию, после совместного содержания с половозрелыми неэкспонированными самцами, самок в течение беременности и молочного вскармливания поили тестируемой жидкостью. Пато-

логических отклонений во внешнем виде и поведении экспериментальных самок зарегистрировано не было, напротив, они более интенсивно набирали массу тела, чем самки контрольной группы. Позитивная тенденция наблюдалась и при анализе исследованных показателей репродуктивной деятельности. Было установлено, что при воздействии на организм УНМ «Таунит», вводимого перорально в исследуемой дозировке, происходит повышение плодовитости самок на 30 %, снижение смертности молодняка на 46 %, а также уменьшение доли неродивших особей на 17 %.

Подобный эффект можно объяснить следующим образом. Различные реакции на одно и то же воздействие в первом и втором экспериментах возможно связаны с особенностями физиологии мужского и женского организмов, которые выражаются в неодинаковых нормах реакции, характерных для каждого из полов [9]. Например, описанное выше возможное нарушение гормонального баланса в мужском организме может вызывать сперматоксический эффект, в то время как в женском организме подобная гормональная картина может стимулировать деятельность репродуктивной системы. Так или иначе, механизмы наблюдаемых нами изменений требуют более глубокого исследования.

Таким образом, проведено исследование влияние промышленно-производимого углеродного наноструктурного материала на различные тест-объекты. Биотестирование на бактериях и микроскопических гидробонтах показало, что исследуемый материал может быть отнесен к 3–4 классу опасности согласно принятой в экотоксикологии классификации. Установлено, что наноматериал оказывает подавляющее действие на процессы раннего вегетативного онтогенеза пшеницы, гороха и подсолнечника, вместе с тем отмечено позитивное влияние наноматериала на всхожесть семян и на защищенность их от гниения, а также на развитие корневой системы. Показано, что пероральное введение коллоидного водного раствора углеродного наноматериала «Таунит» в дозировке 30 мг/кг массы тела является причиной бесплодия у самцов мышей. В то же время, исследуемая дозировка наноматериала стимулирует повышение плодовитости у самок, приводит к снижению смертности молодняка, а также уменьшению доли неродивших особей.

Полученные результаты могут быть учтены при разработке норм содержания углеродных наноматериалов в средах, контактирующих с объектами живой природы и человеком, а также при создании на основе многостенных углеродных нанотрубок лекарственных препаратов нового поколения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Фостер Л.* Нанотехнологии. Наука, инновации, возможности. М.: Техносфера, 2008. 352 с.
2. *Ткачев А.Г., Золотухин И.В.* Аппаратура и методы синтеза твердотельных наноструктур: монография. М.: Изд-во Машиностроение-1, 2007. 316 с.
3. *Арефьева О.А., Рогачева С.М., Кузнецов П.Е.* Наносистемы для доставки химических веществ к корням растений // *Материалы 1 Международного форума по нанотехнологиям.* Москва, 3–5 дек. 2008 г. URL: <http://www.rusnanoforum.ru> (дата обращения: 04.06.2009)
4. *Экология человека / под ред. Б.Б. Прохорова.* М., 2000. 438 с.
5. *Бояркин А.Н.* Быстрый метод определения активности пероксидазы // *Биохимия.* 1951. Т. 16. С. 4.
6. *Онищенко Г.Г.* Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. Методические рекомендации. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 35 с.
7. *Гусев А.А., Ткачев А.Г., Емельянов А.В.* Исследование экологического аспекта безопасности углеродного наноматериала «Таунит» // *Материалы 1 Международного форума по нанотехнологиям.* Москва, 3–5 дек. 2008 г., URL: <http://www.rusnanoforum.ru> (дата обращения 15.06.2009).
8. *Емельянов А.В., Гусев А.А., Ткачев А.Г., Поздняков А.П., Веденева Т.А., Стегачева Т.А., Кузьмин А.С.* Экоотоксикологическая оценка наноматериала «Таунит» с применением тест-системы «Эколюм» // *Биология – наука XXI века: сб. тез. 12 Междунар. Пушкинской школы-конф. молодых ученых.* Пушкино, 2008. С. 294–295.
9. *Геодакян В. А.* Дифференциальная смертность и норма реакции мужского и женского пола // *Журн. общ. биологии.* 1974. Т. 35. № 3. С. 376–385.

БЛАГОДАРНОСТИ: Научно-исследовательская работа проведена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (госконтракты № П 208 от 23.04.2010 г. и № 16.740.11.01-94 от 24.09.2010 г.).

Поступила в редакцию 3 сентября 2010 г.

Gusev A.A., Zaytseva O.N., Polyakova I.A., Gorsheneva E.B., Emelyanov A.V., Shutova S.V., Romantsova S.V., Semiletova S.V., Tkachev A.G., Pilyashenko N.E. Preliminary results of complex biotesting of carbon nanomaterial – perspective carrier of medical drug

The results of complex study of the influence of industrially produced carbon nanostructural material (multiwalled carbon nanotubes) on different test-objects – bacteria, microscopic hydrobionts, high plants, and mammals are presented. It is shown that in big dosage the nanomaterial demonstrates the expressed toxic action which depending on nature of test-object is expressed in increasing lethal level, suppression reproductive activity. At the same time, in small dosage nanomaterial can stimulate the processes of the growth and development, positively influence on factors of the reproduction.

*Key words:* biotesting; multiwalled carbon nanotubes; biosafety; xenobiotics; reproductive toxicity.