

УДК 001.891.32:57.08:543:620.18

## **МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ**

**Трофимова Светлана Алексеевна**

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Трофимова С.А.

185010 Россия, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17

E-mail: [trofimova.sa@mail.ru](mailto:trofimova.sa@mail.ru)

**Аннотация.** Наноматериалы находятся на переднем плане бурно развивающейся области нанотехнологий. Их уникальные свойства находят широкое применение во многих областях человеческой деятельности. Биологическое действие наноматериалов обусловлено как особенностями их состава и строения, так и спецификой организации живого. В работе выделены теоретические и практические аспекты исследования биологического действия наноматериалов.

**Ключевые слова:** наночастицы, наноматериалы, биологическое действие, направления исследований.

УДК 001.891.32:57.08:543:620.18

## **METHODOLOGICAL APPROACHES TO ASSESSMENT OF BIOLOGICAL EFFECTS OF NANOMATERIALS**

**Svetlana A. Trofimova**

Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

S.A. Trofimova

17 Pushkinskaya str., Petrozavodsk, Russia 185010

E-mail: [trofimova.sa@mail.ru](mailto:trofimova.sa@mail.ru)

**Abstract.** Nanomaterials are at the leading edge of the rapidly developing field of nanotechnology. Their unique properties find extensive application in many areas of human activity. Biological effects of nanomaterials are due to the peculiarities of their composition and structure, and are determined by specific organization of living beings. The paper identifies theoretical and practical aspects of the study of biological effects of nanomaterials.

**Keywords:** nanoparticles, nanomaterials, biological effects, directions of research.

В последние десятилетия большой интерес как учёных, так и, в целом, мирового сообщества прикован к нанотехнологиям, основанным на синтезе, сборке и модификации новых веществ, материалов и конструкций на основе элементов, не превышающих 100 нм (Гинзбург, 2008). Следует подчеркнуть, что основная причина обособления явлений этой области и соответствующих понятий обусловлена не столько наноразмерами объектов, сколько их особыми свойствами (тепловыми, магнитными, оптическими, структурными и т.п.), а также методами получения, изучения или использования наноструктур (Годымчук, 2012).

Многообразие наноматериалов определяет разнообразие технологий их получения, которые подразделяют на две большие группы: нанотехнологии «сверху-вниз» (*top-down*) и нанотехнологии «снизу-вверх» (*bottom-up*). Технологический подход «сверху-вниз» основан на том, что при создании изделий преследуется цель уменьшения их размеров путем фрагментации и миниатюризации с переходом от микрообработки к нанообработке. В свою очередь, технологический подход «снизу-вверх» предполагает сборку изделий из отдельных атомов и молекул, а также атомно-молекулярных блоков, структурных фрагментов живых клеток и т.п. (Анищик, 2008).

Известно, что нанотехнологии развиваются на нескольких уровнях, охватывающих материалы, устройства и системы. Наиболее перспективным для научного познания и коммерческого использования в настоящее время следует считать первый из них — уровень наноматериалов (Salata, 2004). В первую очередь, это связано с тем, что наноматериалы содержат структурные элементы в виде наночастиц и обладают качественно новыми свойствами, позволяющими осуществлять их интеграцию в полноценно функционирующие микро- и макросистемы (Каркищенко, 2009).

Свободные (несвязанные) наночастицы встречаются повсеместно: часть из них имеют природное происхождение (взвесь песка в пустынных районах мира, продукты выбросов вулканов, дымовые частицы от лесных пожаров, нанокристаллы морской соли, вирусы); в то время как сажа, выхлопные газы, летучие частицы красок содержат наночастицы антропогенного происхождения; а частицы оксидов титана и кремния, используемые в фармакологии или для получения косметической продукции, частицы металлов или соединений, необходимые для управления химическими реакциями, имеют промышленное происхождение.

Кроме того, наночастицы, составляющие наноматериалы, различаются по химическому составу, форме и пространственной организации (Vuzze, 2007). В состав наноматериалов входят полученные, в основном, инженерными способами углеродные наночастицы (фуллерены, нанотрубки, графены, нанопены, нанопровода и другие); неуглеродные простые частицы на основе кремния, магния, титана, золота, серебра и других металлов; квантовые точки, нанороботы; наночастицы бинарных и композитных соединений, а также препараты наночастиц полимеров, биополимеров и других сложных соединений (Каркищенко, 2009).

Многообразие наноматериалов и наноустройств и сферы их применения столь велики, что это затрудняет не только обобщение информации об их использовании, но и ограничивает возможность предсказать новые области применения наноматериалов и наноустройств (Цао, 2012). Тем не менее, для биологии и медицины систематизация областей использования наноматериалов, основанная на различных свойствах нанокompозитов и различиях в их взаимодействии с биологическими объектами, является важной задачей. Так, наноматериалы могут выступать в качестве:

- флуоресцентных биологических меток;
- транспортных агентов по доставке лекарств и генов;
- биосенсоров для выявления патогенов;
- датчиков для обнаружения белков;
- ДНК-микрочипов для детекции и анализа ДНК;
- основы для тканевой инженерии;

- реагентов для разделения и очистки биологических молекул и клеток;
- контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии;
- маркеров для количественной оценки подвижности клеток и т.д. (Salata, 2004).

Следует подчеркнуть, что обладая уникальными физико-химическими свойствами, наноматериалы и наноконструкции отличаются также и широким спектром биологического действия (Таблица). Их влияние на живые организмы, в том числе токсическое, обусловлено высокой химической и каталитической активностью поверхности наночастиц, отсутствующей у того же вещества, имеющего более крупную дисперсность, и высокой концентрацией наночастиц в воздухе при незначительном количестве распыленного вещества (Супотницкий, 2009).

Следует подчеркнуть, что для абсолютного большинства наноматериалов не известны механизмы поступления в организм, биосовместимости, биотрансформации, транслокации в органах и тканях, механизмы элиминации, и, что особенно важно, их токсичности (Каркищенко, 2009).

Для живых организмов, как сложно устроенных систем, выделяют несколько уровней организации: молекулярный, субклеточный, клеточный, организменный, популяционно-видовой, биогеоценотический, биосферный. Воздействие наноматериалов в той или иной степени охватывает все уровни организации биологических систем.

**Таблица.** Биологическое действие нановеществ (Анциферова, 2013)

Физико-химические особенности поведения нановеществ	Изменение физико-химических свойств и биологического (в том числе, токсического) действия
Небольшие размеры и высокое разнообразие форм наночастиц	возможно связывание с нуклеиновыми кислотами, белками, встраивание в мембраны, проникновение в клеточные структуры и, как результат, изменение функций биоструктур. Процессы переноса наночастиц в окружающей среде с воздушными и водными потоками, их накопления в почве, донных отложениях могут также значительно отличаться от поведения частиц более крупного размера
Высокая адсорбционная активность	возможна адсорбция на наночастицы различных контаминантов и облегчение их транспорта внутрь клетки, что резко увеличивает токсичность последних. Многие наноматериалы обладают гидрофобными свойствами или являются электрически заряженными, что усиливает процессы адсорбции на их поверхности различных токсикантов и способность последних проникать через естественные барьеры организма
Высокая способность к аккумуляции	возможно, что из-за малого размера наночастицы могут не распознаваться защитными системами организма, не подвергаться биотрансформации и не выводиться из организма, что ведет к накоплению наноматериалов в растительных, животных организмах, а также в микроорганизмах, к передаче по пищевой цепи и, в результате, к увеличению их поступления в организм человека

В живых организмах наноструктурный уровень организации представлен макромолекулами, органоидами клеток и вирусами (Vuze, 2007; Цао, 2012). Для бионанотехнологий наиболее сложными и многофункциональными наноструктурами являются молекулярные комплексы, регулирующие и контролируемые биологические

системы. Так, например, белки — универсальные наноразмерные молекулярные комплексы — контролируют молекулярный транспорт, метаболизм, сенсорные и информационные свойства биологических систем (Азаренков, 2009).

Взаимодействие наночастиц с белками детально рассмотрено в обзоре Saptarshi и соавт., опубликованном в *Journal of Nanobiotechnology* в 2013 году (Saptarshi, 2013). В частности, авторы раскрывают понятие «*nanoparticle-protein corona*» (NP-PC) — «белковая корона наночастицы» — молекулы белков на поверхности наночастиц. Возникающие при участии наночастиц конформационные изменения белковых молекул могут привести, в частности, к иммунологическому распознаванию комплекса как «зашифрованного». Кроме того, по данным разных исследователей, наночастицы вызывают также, например, потерю спиральной структуры бычьего сывороточного альбумина (в случае частиц Al и гидроксиапатита размером 100 — 300 нм), небольшие конформационные изменения вторичной структуры этого же белка (в случае наночастиц Zn и Au размером 5 — 100 нм), полимеризацию тубулина (для частиц TiO<sub>2</sub> размером 20 нм) и т.д.

Следует подчеркнуть, что белки «короны» обеспечивают взаимодействие наночастиц с клетками, облегчая их трансмембранный перенос при фагоцитозе, пиноцитозе и рецептор-опосредованном эндоцитозе (Saptarshi, 2013), что способствует аккумуляции наночастиц в клеточных структурах. Авторы отмечают также, что наночастицы диаметром менее 100 нм способны попадать в клетки, менее 40 нм — в клеточное ядро, и менее 35 нм — преодолевать гематоэнцефалический барьер, избирательно регулирующий обмен веществ между кровью, цереброспинальной жидкостью и центральной нервной системой. В статье приведена также информация о методах, с помощью которых можно исследовать физические характеристики наночастиц и взаимодействие наночастиц с белками и клетками (Saptarshi, 2013).

Еще один из недавно опубликованных обзоров посвящен вопросам взаимодействия наночастиц, полученных инженерными способами, с живыми клетками (Shang, 2014). Основное внимание авторов сосредоточено на влиянии размера наночастиц на клетки. В работе, в частности, отмечено, что мелкие наночастицы обладают большей цитотоксичностью, по сравнению с более крупными. Токсичность наночастиц определяется не только их размером, но и формой. Наночастицы дендрической и веретенообразной формы обладают более высокой цитотоксичностью нежели частицы сферической формы. Большая токсичность характерна также для катионных наночастиц, по сравнению с анионными и нейтральными.

Несомненно, важную роль в реакциях клеток и целых организмов на воздействие наночастиц и наноматериалов играет систематическое (таксономическое) положение объекта воздействия. В диссертационной работе Минулиной Р.Т. (Минулина, 2014) проведена оценка токсичности наноматериалов с использованием микроорганизмов, а именно ответ бактерий (кишечной палочки), микромицетов (пекарских дрожжей) и одноклеточных водорослей (хлореллы) на воздействие серебряных и магнитных наночастиц. Автором было обнаружено, что магнитные наночастицы образовывали плотный слой, а серебряные наночастицы располагались на поверхности клеток диффузно. Полимерные пленки с наночастицами задерживали деление клеток, но незначительно влияли на их ферментативную активность. В работе было также показано, что серебряные наночастицы проникали совместно с клетками микроорганизмов-носителей в организм свободно живущей нематоды *Caenorhabditis elegans* и оказывали ингибирующий эффект на рост и размножение нематод. Таким образом, было продемонстрировано перемещение наночастиц по пищевой цепи и их опосредованное отрицательное воздействие на многоклеточные организмы.

Результаты биотестирования углеродного наноматериала «Таунит» на примере культуры зеленых протококковых водорослей, микроскопических рачков — цериодафний, тест-системы «Эколюм» — на примере культуры люминесцентных генноинженерных бактерий (*Escherichia coli* M-17, 1885), яровой пшеницы (*Triticum durum* Desf., 1818, сорт - *Эстер*) и домашней мыши (*Mus m. domesticus* Linnaeus, 1758) — рассмотрены в работе Гусева и соавт. (Гусев, 2009).

У растений было обнаружено, что некоторые виды (например, тыква, лимская фасоль) обладали способностью отфильтровывать наночастицы, избегая их воздействия, в отличие от других культур (капуста, морковь, пшеница, огурец, соя), которые их аккумулировали (Астафурова, 2011). Таким образом, помимо исследования влияния наночастиц оксида алюминия и титана на морфофизиологические показатели сельскохозяйственных растений, была подтверждена значимость биологической модели для подобного рода экспериментов.

Следует отметить, что в зависимости от эффекта воздействия на живые организмы наноматериалы можно разделить на две группы: токсичные, в том числе обладающие антисептическими и бактерицидными свойствами, и биологически совместимые, представляющие интерес как средства мониторинга состояния организма на клеточном и субклеточном уровне, как новые биологические сенсоры и как новые лекарства.

Оценка биологического действия как токсичных, так и биологически совместимых материалов должна включать не только биохимические, цитометрические, иммунологические, электронномикроскопические методы исследования, но и методы биотестирования с учётом биотических связей в экосистемах, принимающие во внимание способность наночастиц к ингаляционному, трансдермальному, транснейральному и энтеральному проникновению в любые органы и ткани человека, включая центральную нервную систему (Супотницкий, 2010).

В России разработаны и в 2007 году утверждены Постановлением Госсанэпиднадзора «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» и Приказом Роспотребнадзора – методические рекомендации «Оценка безопасности наноматериалов» (Каркищенко, 2009). И, по-видимому, используемые критерии оценки биологического действия наноматериалов будут развиваться и дополняться вслед за развитием нанотехнологий.

Обобщая вышесказанное, можно выделить теоретический и практический аспекты исследования биологического действия наноматериалов. На теоретическом уровне это изучение:

- путей поступления компонентов наноматериалов различного химического состава и строения в живые организмы;
- механизмов их перемещений и превращений в метаболических реакциях;
- участия наноматериалов в регуляторных процессах в биологических системах;
- включения в биологические системы и превращения нанокompозитов и их компонентов на разных уровнях организации биологических систем;
- видоспецифического влияния наноматериалов в зависимости от таксономической принадлежности организма.

На практическом уровне это:

- исследование областей и сфер применения наноматериалов с учётом их токсичной или биологически совместимой природы;
- расширение спектра и совершенствование методов изучения наноматериалов и их компонентов;
- создание наноматериалов с помощью живых организмов.

## Библиография

1. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2007, 2(4):MR17-71.
2. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* 2004, 2:3-9.
3. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineering nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* 2014, 12:5.
4. Saptarshi SR, Duschi A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-

reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology* 2013, 11:26.

5. Анциферова И.В., Макарова Е.Н. Методы производства наноматериалов и возможные экологические риски // Вестник ПНИПУ. Машиностроение, материаловедение. – 2013. – Т.15. – №4. – С. 59-67.
6. Азаренков Н.А., Береснев В.М., Погребняк А.Д., Маликов Л.В., Турбин П.В. Наноматериалы, нанопокрyтия, нанотехнологии: Учебное пособие. Х.: ХНУ имени В.Н.Каразина, 2009. 209 с.
7. Анищик В.М., Борисенко В.Е., Жданок С.А., Толочко Н.А., Федосюк В.М. Наноматериалы и нанотехнологии. Минск: Изд. Центр БГУ, 2008. 375 с.
8. Астафурова Т. П., Моргалев Ю.Н., Зотикова А.П., Верхотурова Г.С., Михайлова С.И., Буренина А.А., Зайцева Т.А., Постовалова В.М., Цыцарева Л.К., Боровикова Г.В. Влияние наночастиц диоксида титана и оксида алюминия на морфофизиологические параметры растений // Вестник Томского государственного университета. – 2011. – №1(13). – С.113-121.
9. Гинзбург Б.М., Елецкий А.В., Пиотровский Л.Б., Фалеев С.П., Фукс А.М. Актуальность развития нанотехнологий и nanoиндустрии в России // Инноватика и экспертиза. – 2008. – Вып.1(2). – С.42-47.
10. Годымчук А.Ю., Савельев Г.Г., Зыкова А.П. Экология материалов: учебное пособие. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 272 с.
11. Гусев А.А., Емельянов А.В., Шутова С.В., Ткачев А.Г, Поздняков А.П., Пиляшенко Н.Е., Зайцева О.А. Исследование биологических аспектов безопасности многостенных углеродных нанотрубок // Электронный научный журнал «Актуальные инновационные исследования: наука и практика». – 2009. – №3.
12. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // Биомедицина. – 2009. – №1. – С.5-27.
13. Минуллина Р.Т. Оценка токсичности наноматериалов с использованием микроорганизмов. Дисс. ... канд.биол.наук: Казань, 2014. 141 с.
14. Супотницкий М.В., Паныгина С.А., Поклонский Д.Л., Волков М.Ю. Оценка потенциальной биологической опасности наночастиц // Ветеринарная медицина. – 2009. – №3. – С.12-16.
15. Цао Г., Ван И. Наноструктуры и наноматериалы. Синтез, свойства и применение. М.: Научный мир, 2012. 520 с.