

На правах рукописи



АБРАМЕНКО НАТАЛИЯ БОРИСОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ГИДРОБИОНТАХ**

02.00.04 - физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории экологической химии кафедры общей химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», в лаборатории разработки и исследования полифункциональных катализаторов ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН» и в лаборатории экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН».

Научный руководитель:

Кустов Леонид Модестович - доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ягодовский Виктор Дмитриевич - доктор химических наук, профессор кафедры физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Ершов Юрий Алексеевич - доктор химических наук, профессор кафедры БМТ-2 медико-технических информационных технологий ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН»

Защита состоится «14» апреля 2017 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.90 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119001, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, ауд. 446.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ломоносовский просп., д. 27 и на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: <http://www.chem.msu.ru/>.

Автореферат диссертации размещен на сайте химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (<http://www.chem.msu.ru>) и на сайте ВАК (<http://vak.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «.....» 2017 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.90

кандидат химических наук, доцент



Шилина М.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние десятилетия существенно возрос интерес к изучению наноразмерных частиц, в частности, наночастиц (НЧ), содержащих тяжелые металлы. В первую очередь, это связано с тем, что свойства нанообъектов существенно отличаются от свойств макрообъектов. Исследования последних лет привели к открытию новых возможностей применения НЧ для получения конструкционных и функциональных материалов с качественно новыми характеристиками, которые находят широкое применение в различных областях науки и техники. Так, в последнее время НЧ используются для получения высокоактивных и селективных катализаторов, создания элементов микроэлектронных и оптических устройств. В частности, весьма перспективным является практическое применение НЧ для медицинских и биологических целей.

Между тем в связи с широким применением наноматериалов (НМ) в различных областях человеческой деятельности в последние годы возникают вопросы, связанные с безопасностью использования и употребления продуктов и препаратов, в состав которых входят НЧ. Эти проблемы тем более становятся актуальными, что с каждым годом объемы применяемых НМ в коммерческих продуктах продолжает экспоненциально расти.

Рост объемов производства НМ и их успешное внедрение вызывают естественные опасения по поводу проявления специфических наноразмерных эффектов для живых организмов. В связи с этим, возможное влияние применяемых нанотехнологий на окружающую среду делает крайне актуальным необходимость полномасштабного изучения биологической безопасности НЧ с учетом всех их физико-химических свойств и иных характеристик.

Вероятные сценарии негативного воздействия НЧ на живые организмы, в том числе и на человека, подробно рассмотрены в целом ряде исследований. Однако в преобладающем большинстве работ по токсичности НМ рассматривается лишь влияние размера НЧ на их экотоксичность. Вполне очевидно, что при оценке экологической безопасности нанообъектов необходимо рассматривать также и другие характеристики НЧ.

Следует заметить, что в последнее время фронт экспериментальных исследований по токсичности НЧ заметно отстает от быстрого прогресса нанотехнологий. Между тем, существует и успешно применяется в органической и фармацевтической химии недорогая и эффективная альтернатива экспериментальным тестам на токсичность - это компьютерное моделирование и прогнозирование негативного воздействия на биологические объекты, которые основаны на корреляционной зависимости «структура-свойство». При анализе свойств НЧ как экотоксикантов использование такого подхода позволяет резко сократить число экспериментов и тем самым оперативно получать необходимые сведения. Подобные методы в

последние годы все чаще применяются в работах, связанных именно с оценкой токсичности НЧ.

В настоящей работе был разработан такой "гибридный" подход к выявлению факторов, определяющих токсичность НЧ, в который входит, с одной стороны, экспериментальное изучение токсичности серебряных НЧ, и, с другой - математическое моделирование с использованием базы данных OCHEM.eu в рамках методологии QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships).

В соответствии с поставленной задачей первая часть диссертационной работы посвящена экспериментальному определению физико-химических характеристик водных суспензий НЧ серебра как факторов, определяющих как их агрегативную устойчивость, так и токсичность в отношении различных гидробионтов - водных организмов. Для экспериментов были выбраны НЧ серебра, поскольку именно они находят весьма широкое применение в самых различных областях. Задачей этой части работы было выявление ключевых факторов, которые определяют токсичность серебряных НЧ. В частности, было рассмотрено влияние формы наночастиц серебра и природы стабилизатора водных суспензий НЧ серебра на их токсические показатели.

Вторая часть работы посвящена разработке математических моделей, которые позволяют не только описывать, но и прогнозировать токсичность неорганических НЧ в отношении водных организмов. Для этого был проведен анализ литературных данных по токсичности НЧ металлов и оксидов металлов в отношении различных гидробионтов, а также по характеристикам НЧ, в частности, их природе, размеру и форме, а также применяемым стабилизаторам суспензий.

Целью данной работы являлось установление связи между биологической активностью серебряных НЧ в отношении некоторых гидробионтов и характеристиками таких наночастиц, а также разработка математических моделей, описывающих токсичность НЧ в зависимости от их основных физико-химических и других характеристик, и оценка релевантности разработанных моделей с экспериментальными результатами.

Задачи исследования заключались в следующем:

1 Получить и охарактеризовать суспензии НЧ серебра разной формы и стабилизированные веществами разной природы (анионной, катионной и амфотерной). Проанализировать агрегативную устойчивость суспензий НЧ серебра и изменение их физико-химических характеристик в условиях эксперимента.

2 Оценить токсичность НЧ серебра в отношении различных видов водных организмов - водорослей, дафний, моллюсков, плоских червей и эмбрионов рыб. Выявить наиболее чувствительные виды организмов по отношению к НЧ серебра.

3 Проанализировать степень влияния размера и формы НЧ серебра, а также природы стабилизатора на их агрегативную устойчивость и состояние в условиях остановки эксперимента и токсичность.

4 Найти оптимальную совокупность характеристик НЧ (Me и Me₂O_x) для описания их структуры и разработки математических моделей токсичности неорганических НЧ. Провести оценку адекватности полученных моделей на экспериментальных результатах.

Научная новизна. Разработаны оригинальные методики оценки токсичности НМ с использованием планарий и моллюсков. Впервые проведено тестирование коммерческих НЧ серебра Agbion на пяти видах гидробионтов. Проанализировано влияние формы НЧ и используемого стабилизатора на свойства НЧ и их токсичность в отношении эмбрионов рыб. Впервые проведен анализ токсичности широкого спектра стабилизаторов и установлен их вклад в токсичность суспензий НЧ.

Построены модели QSAR с использованием собственных результатов и экспериментальных данных, взятых из литературных источников. Для математического описания токсичности НЧ были использованы классические дескрипторы и физико-химические свойства наночастиц, а так же размер и форма НЧ.

Научная и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют и углубляют представления о влиянии физико-химических характеристик НЧ на токсичность в отношении гидробионтов. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при производстве безопасных НМ и разработке так называемых «зеленых» технологий. Разработанные модели позволяют предварительно определить класс токсичности НЧ и могут быть использованы для оценки токсичности новых НМ.

Личный вклад автора состоит в поиске, анализе и обобщении научной информации по способам синтеза НЧ, их биологической активности, а также в выборе наиболее перспективных подходов к моделированию токсичности НЧ. Автором проведён основной эксперимент по характеристике физико-химических свойств НЧ и их токсичности для гидробионтов. Диссертант самостоятельно интерпретировала результаты исследования наночастиц серебра различными физико-химическими методами (ПЭМ, DLS, NTA, AAS, УФ - спектроскопия). Автор принимала участие в планировании и постановке конкретных задач диссертации на всех этапах её выполнения, в обсуждении результатов, подготовке публикаций и докладов. Синтез НЧ серебра, стабилизированных поверхностно-активными веществами различной природы, был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории химии поверхности, химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Формирование и наполнение базы данных по токсичности НЧ и моделирование проведены совместно с сотрудниками Института

биоорганической химии и нефтехимии НАН (Украина) и научно-исследовательского центра Helmholtz Zentrum München (Германия).

Настоящая работа является частью исследований по изучению и моделированию экологической токсичности НЧ, проводимых совместно с исследовательскими центрами и институтами: Leiden University, Institute of Environmental Sciences (CML); National Institute of Public Health and the Environment-RIVM, (Нидерланды); Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН (Украина).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект RFMEFI61614X0014), в рамках проекта NATO SfPP984401, в сотрудничестве с концерном «Наноиндустрия».

Степень достоверности и апробация работы. Основное содержание работы изложено в 15 публикациях (из них 4 статьи в журналах, 1 статья в сборнике и 10 тезисов докладов). Результаты работы были представлены в виде устных сообщений и тезисов докладов на конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014), Conference Munich Interact 2012 (Munich, Germany, 2012); 1st International Symposium "Nanomaterials and Environment" (Moscow, 2013); ECO Final Conference 2013 (Germany, 2013); International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies, SENN 2015 Conference (Helsinki, Финляндия, 2015); 2nd International Symposium "Nanomaterials And Environment" (Moscow, 2015); Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2015) (Toulouse, France, 2015); NANOCON 2015. (Czech. Republic, 2015), 3rd International Symposium "Nanomaterials and Environment" (Moscow, 2016), International Symposium "Nanostructured adsorbents and catalysts" (Moscow, 2016).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной и расчетной частей с обсуждением результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста. Иллюстрационный материал представлен 25 рисунками и 24 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 156 источника.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наночастицы серебра могут проявлять не только сопоставимую, но и существенно большую биологическую активность по сравнению с ионами серебра. Плоские НЧ более токсичны для эмбрионов рыб, чем сферические НЧ меньшего размера.

2. Природа стабилизирующего вещества оказывает существенное влияние на токсичность суспензий НЧ серебра. Токсичность определяется присутствием соединений серебра, наличием стабилизатора или комбинированным воздействием обоих компонентов.

3. Использование физико-химических и других характеристик НЧ в качестве

дескрипторов позволяет описать строение НЧ и разрабатывать модели QSAR для достоверного представления токсичности НЧ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

I. ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и основные задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость работы.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе «Обзор литературы» рассматриваются основные особенности НЧ, их отличия от макрообъектов и специфические свойства. Обсуждаются преимущества и недостатки использования НМ, и потенциальные последствия распространения продукции, включающей НМ. Проводится анализ имеющейся литературы по токсичности НЧ, на основе которого делается заключение о наиболее токсичных и требующих пристального внимания типах НЧ. Анализируется взаимосвязь физико-химических и других характеристик НЧ и их токсичности, и обсуждаются механизмы токсического воздействия НЧ на живые организмы.

Рассматриваются альтернативные методы получения информации по токсичности НЧ, такие как математическое моделирование и прогнозирование. В частности, новое направление в моделировании, посвященное описанию и прогнозированию свойств НМ - Nano-QSAR. Модели QSAR – это выраженная математически зависимость свойства вещества от его структуры. Также рассматривается возможность использования характеристик НЧ для описания их токсических свойств. Приводятся несколько примеров использования компьютерных моделей для описания свойств НЧ. Проводится анализ экспериментальных данных с целью определения возможности их использования для построения моделей. Обсуждаются характеристики наиболее часто используемых тест-объектов и описываемые показатели токсичности НЧ. Анализируются свойства НЧ и их характеристики с точки зрения влияния на живые организмы. Проводится сопоставление наиболее изученных свойств НЧ и их влияние на токсичность НМ.

В заключении сформулированы выводы, к которым приводит анализ литературных данных, и формулируются вытекающие из обзора литературы задачи экспериментальной и теоретической частей работы.

III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

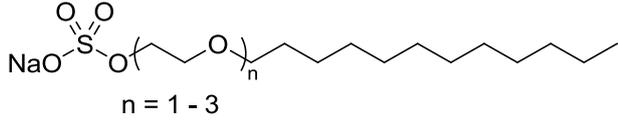
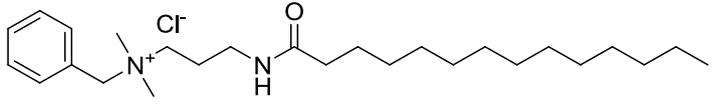
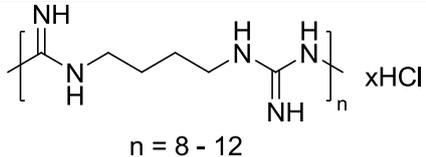
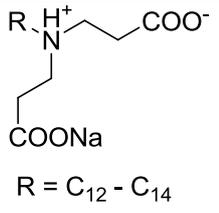
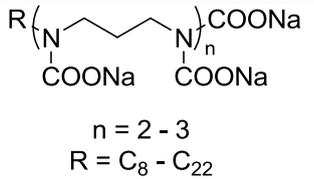
В первом (экспериментальном) разделе перечислены реактивы и методы получения серебряных НЧ, описаны методы исследования физико-химических характеристик и

токсичности получаемых образцов НЧ.

Синтез суспензий серебра. В данном разделе представлены методики получения НЧ серебра различной формы и размера. Все соединения можно разбить на две группы: сферические НЧ с ПАВ различной природы (Таблица 1) и несферические НЧ разной формы, полученные при разном времени нагрева (Ag_1.i) и с разными концентрациями восстановителя (Ag_2.i).

Сферические НЧ, стабилизированные смесью цитрата натрия (Cit) и поливинилпирролидона (PVP) были получены методом химического восстановления (Ag_3.1). Наночастицы с наименьшим размером были получены восстановлением Ag^+ под действием γ -излучения радиоактивного источника ^{60}Co в водном растворе, содержащем $1 \cdot 10^{-4}$ М $AgClO_4$, $1 \cdot 10^{-3}$ М $HCOONa$ и $5 \cdot 10^{-4}$ М полифосфата натрия (Ag_3.2).

Таблица 1. Стабилизаторы, использованные при синтезе суспензий НЧ серебра

Стабилизатор	Формула	Обозначение
Анионный ПАВ (сульфоэтоксилат додеканола)	 $n = 1 - 3$	I
Катионный ПАВ (хлорид бензилдиметил[3-(миристоиломино)пропил]аммония)		II
Катионный полимер (полигексаметилен-бигуанидхлорид)	 $n = 8 - 12$	III
Амфотерный ПАВ (кокодипропионат натрия)	 $R = C_{12} - C_{14}$	IV
Амфотерный ПАВ (талловый амфополикарбоксииглицинат)	 $n = 2 - 3$ $R = C_8 - C_{22}$	V

Дополнительно были изучены высокостабильные суспензии НЧ композита переменного состава Ag_xAgCl (где $x < 1$), стабилизированного амфотерным ПАВ (талловый амфополикарбоксииглицинат).

Физико-химические методы исследования полученных материалов. В работе использовали просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ), УФ-спектроскопию, динамическое светорассеяние (DLS) и метод анализа траекторий наночастиц (NTA). Определение содержания металлов в тканях животных проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС).

Для суспензий НЧ серебра получали спектры поглощения, средние размеры НЧ определяли с помощью ПЭМ и методов DLS и NTA¹. Измерение ζ -потенциалов проводили путем наложения электрического поля на кювету с суспензией НЧ серебра с использованием методики, основанной на лазерной доплеровской анемометрии.

Проводили анализ агрегативной устойчивости коллоидных растворов серебра в условиях эксперимента и при разбавлении водой.

Методы исследования токсичности образцов. В работе были проведены эксперименты по определению влияния НЧ серебра на развитие и жизнедеятельность различных видов гидробионтов.

Объектами для биологических исследований служили водоросли *Chlorella vulgaris Beijer*, двухстворчатые моллюски *Unio tumidus*, плоские черви - планарии *Jirardia tigrina*, пресноводные рачки *Daphnia magna*, развивающаяся икра рыб *Danio rerio*. Основными критериями токсичности НЧ серебра служили: для *Unio tumidus* и *Danio rerio* - полулетальная концентрация, снижение двигательной функции у рачков *Daphnia magna*, подавление роста водорослей *Chlorella vulgaris Beijer*, замедление регенерации планарий *Jirardia tigrina*, изменение сердечных ритмов и накопление серебра в тканях моллюсков *Unio tumidus*. На этапе отработки методик в качестве тестируемого вещества использовали НЧ серебра препарата концерна «Наноиндустрия» Agbion.

Было проанализировано влияние формы серебряных НЧ и стабилизирующего компонента на агрегативную устойчивость и токсичность НЧ Ag в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*. Изучено состояние НЧ серебра при разведении водой и в условиях постановки эксперимента. Проведена оценка токсичности стабилизирующих веществ в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*.

Статистическая обработка результатов. Все результаты проведенных исследований представлены в виде значений средних арифметических величин, рассчитанных по данным не менее трех экспериментов. Для оценки значений полулетальной концентрации использовали нелинейный регрессионный анализ (сигмоидальная зависимость смертности эмбрионов от

¹ Автор выражает благодарность Машкину П.В. за помощь в проведение экспериментов по токсичности наночастиц в отношении моллюсков; автор признателен сотрудникам МГУ имени Ломоносова: Абрамчуку Сергею Савельевичу за получение микрофотографий ПЭМ и Евтушенко Евгению Геннадиевичу за данные по характеристике НЧ методом NTA

концентрации НЧ серебра). Расчеты проводили в программе *GraphPrism 5.0*.

Во втором разделе, посвященном математическому моделированию, показаны возможности использования базы данных OCHEM.eu и методов QSAR для моделирования токсичности НЧ. Дается описание моделируемых показателей токсичности НЧ и используемых выборок экспериментальных данных, также приводится описание используемых дескрипторов и математического аппарата.

Основной задачей этой части работы было построение математических моделей токсичности НЧ металлов и оксидов металлов, а также проверка возможности применения методов QSAR для описания свойств НЧ. Разработку моделей токсичности НЧ проводили на основе базы для хранения и обработки данных <https://OCHEM.eu/>. Это химическая база данных на основе web-платформы с возможностью наполнения, редактирования и хранения данных, она также включает математический аппарат для построения моделей и интерпретации расчетных данных.

Основные физико-химические характеристики НЧ, а также размер и форму НЧ использовали в качестве обязательных параметров при работе с базой данных OCHEM.eu. В основу были положены следующие свойства НЧ: химический состав, средний размер и форма НЧ, тип стабилизатора, удельная поверхность, ζ -потенциал и гидродинамический диаметр НЧ. Основные показатели токсичности НЧ, используемые при введении в базу данных, представлены в Таблице 2.

Собранные данные охватывают различные показатели токсичности и, отчасти, разные условия экспериментов, биологические объекты, химический состав тестируемых соединений.

Таблица 2. Показатели токсичности НЧ, выбранные для моделирования

Свойство	Описание
LC ₅₀ (полулетальная концентрация)	Концентрация вещества, при которой гибнет 50% популяции в заданный временной интервал
EC ₅₀ (эффективная концентрация)	Концентрация вещества, при которой анализируемый показатель уменьшается в два раза от начального значения
LD ₅₀ (полулетальная доза)	Средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы
MIC (минимальная ингибирующая концентрация)	Минимальная концентрация вещества, при которой наблюдаются подавляющие свойства

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были исследованы суспензии НЧ серебра разной формы и размера, стабилизированные различными веществами. Форму и размер НЧ определяли с помощью ПЭМ. Примеры форм полученных сферических и плоских НЧ серебра приведены на Рисунке 1.

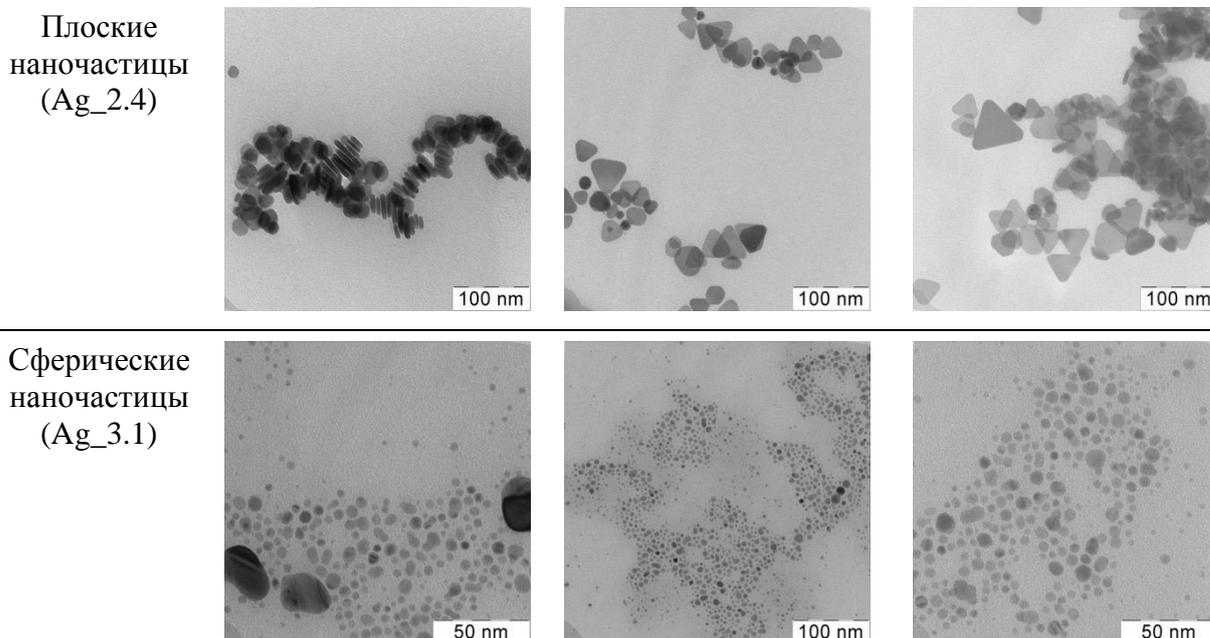


Рисунок 1. Микрофотографии (ПЭМ) сферических и плоских НЧ серебра.

В случае частиц наносеребра с разными стабилизаторами получались сферические частицы разного размера. На Рисунке 2 приведены типичные снимки, полученные методом ПЭМ для НЧ серебра, стабилизированных талловым амфополикарбоксиглицинатом.

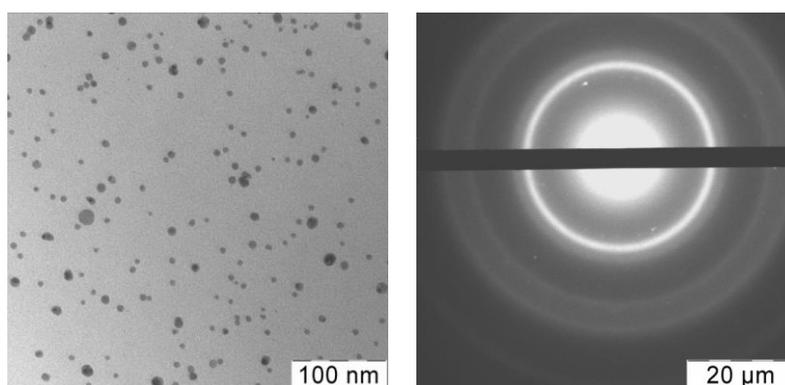


Рисунок 2. Микрофотография (ПЭМ) и микродифрактограмма (метод «черного поля») НЧ серебра, стабилизированных талловым амфополикарбоксиглицинатом.

Наночастицы предварительно были исследованы с целью выяснения, насколько устойчивы растворы суспензий при разведении водой и в инкубационной среде (ИС / EW – E3 стандарт). Для этого путем последовательного разведения готовили водные суспензии НЧ серебра одинаковой концентрации. Рабочая концентрация составила 10 мг/л. Дополнительно проводили анализ свойств НЧ с концентрацией 5 мг/л в инкубационной среде для рыб *Danio*

rerio. В Таблице 3 представлены результаты измерений для плоских НЧ и суспензий с разными стабилизирующими компонентами.

Таблица 3. Физико-химические свойства суспензий НЧ серебра

Наночастицы	ζ-потенциал, мВ	Дср НЧ, нм	Устойчивость в водных растворах*	ζ-потенциал в инкубационной среде, мВ	Дср НЧ в инкубационной среде, нм	Устойчивость в инкубационной среде*
Ag_I	-46,2	7,5	Нет	-48,9	22,3	Да
Ag_II	+54,2	25,0	Нет	-3,1	124,4	Нет
Ag_III 1 мг/л	+39,1	7,0	Да	42,7	13,5	Да
Ag_III 0,2 мг/л	+46,4	3,5	Да	6,8	65,3	Нет
Ag_IV 12 мг/л	-55,6	9,5	Да	-50,3	13,8	Да
Ag_IV 5 мг/л	-45,3	14,0	Да	-35,9	13,8	Да
Ag_V	-17,1	8,5	Да	-23,8	26,3	Да
Ag ₂ Cl_V	-69,2	31,9	Да	-59,7	54	Да
Ag_1.1	-40,2	47,2)	Да	-83,2	84	Да
Ag_1.2	-24,7	24,8	Да	-58,7	46	Да
Ag_1.3	-46,5	18,7	Да	-60,5	79	Да
Ag_2.1	-76,2	21,5	Да	-83,2	44	Да
Ag_2.2	-63,9	23,5	Да	-76,9	53	Да
Ag_2.3	-40,8	12,6	Да	-73,8	79	Да
Ag_2.4	-28,1	27,7	Да	-94,69	69	Да
Ag_3.1	-21,1	7,5	Да	-48,6	230	Да
Ag_3.2	-25,1	4,0	Да	-85,1	112	Да

*-данные для плоских НЧ получены в нитратной среде (пояснения в главе 4.3). Рабочие концентрации 5 и 10 мг/л. Дср – среднее значение диаметра НЧ

Как видно, ζ-потенциал по абсолютной величине и по знаку зависит от химического строения стабилизатора. Катионные ПАВ дают положительные значения ζ-потенциала, тогда как анионные ПАВ приводят к отрицательным значениям ζ-потенциала, амфотерные же ПАВ показывают самые высокие по абсолютной величине отрицательные значения ζ-потенциала.

По данным спектральных исследований и измерений DLS большинство коллоидов НЧ серебра стабильны при разбавлении водой и добавлении инкубационной среды. Исключение составили образцы Ag_I и Ag_II, стабилизированные сульфэтоксилатом додеканола и кокодипропионатом натрия, для которых при разбавлении наблюдали признаки дестабилизации и образование осадка. Природа стабилизатора существенно влияет на устойчивость суспензий НЧ в экспериментальной среде. Вполне очевидно, что имеют место различные механизмы стабилизации НЧ серебра, которые и обуславливают разницу в устойчивости исследованных

коллоидных растворов и наблюдаемые отличия при разбавлении водой и инкубационной средой.

Экспериментальное исследование токсичности наночастиц серебра

На предварительном этапе был проведен сравнительный анализ методик по тестированию экотоксичности НЧ серебра на примере коммерческих образцов препарата Agbion. Все биологические объекты проявили высокую чувствительность к присутствию НЧ серебра в среде. Кроме того, наблюдалось существенный токсический эффект самого стабилизатора диоктилсульфосукцината натрия для всех тест – объектов (Таблица 4).

Таблица 4. Результаты предварительных тестирований для пяти тест-объектов

Тест - объект	Показатель токсичности	Результаты	Комментарии
Водоросли <i>Chlorella Vulgaris Beijer</i>	Безвредная концентрация (БК)	БК (Ag) = 0,07 мг/л БК (стаб.) = 71 мг/л	Совместное действие стабилизатора и НЧ серебра
Двустворчатые моллюски <i>Unio tumidus</i>	Время гибели половины тест - объектов (ЛД ₅₀)	ЛД ₅₀ (0,75) = 27 ч. ЛД ₅₀ (05) = 60 ч. ЛД ₅₀ (0,25) = 80 ч. ЛД ₅₀ (0,1) > 7 суток	Стабилизатор проявляет высокую токсичность
Плоские черви планарии <i>Jirardia tigrina</i>	Показатель по регенерации (R)	R(96 ч) = -21,61% R(148 ч) = -13,43%	Подавление регенерации
Пресноводные рачки <i>Daphnia magna</i>	Показатели по иммобилизации: полулетальная (LC ₅₀) и безвредная концентрации (БК)	Данные по Ag: LC ₅₀ (96 ч) = 0,12 мг/л, БК (96 ч)=0,05 мг/л. Данные по стаб.: LC ₅₀ (96 ч) = 9,5 мг/л, БК (96 ч)=5,7 мг/л	Токсичность обусловлена наличием стабилизатора, а при низких концентрациях – НЧ серебра
Рыбы <i>Danio rerio</i>	Показатель по гибели (LC ₅₀) и скорость выхода из оболочки (EC ₅₀)	LC ₅₀ (96 ч) = 0,23 мг/л, EC ₅₀ (96 ч) = 0,21 мг/л Стаб: LC ₅₀ (96 ч) = 20-40 мг/л	Смешанный механизм токсичности стабилизатора и НЧ

Для дальнейшей работы по выявлению определяющих факторов токсичности серебряных НЧ в отношении гидробионтов было решено использовать методику с эмбрионами рыб *Danio rerio*, как одну из самых оптимальных. Методика хорошо изучена, а данный

биологический вид характеризуется четкими критериями оценки токсического эффекта и является одним из самых чувствительных в отношении НЧ серебра.

Влияние формы наночастиц серебра на жизнеспособность зародышей рыб

Независимо от условий синтеза, растворы суспензий НЧ Ag одной формы оказывали одинаковое действие на развитие икринок. На Рисунке 3 представлены объединенные показатели для НЧ серебра различной формы и нитрата серебра.

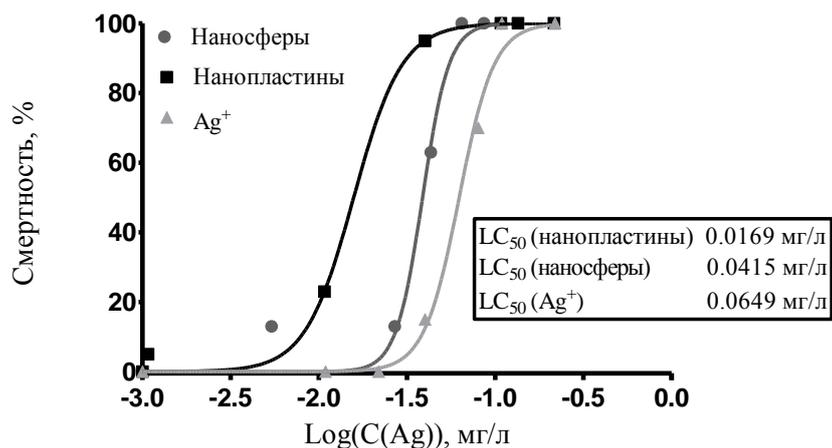


Рисунок 3. Зависимость показателя смертности эмбрионов *Danio rerio* в присутствии плоских и сферических НЧ серебра, а также ионов серебра (AgNO_3) от концентрации серебра в растворе в полулогарифмических координатах.

Как показывают данные, обе формы НЧ серебра проявляют большую токсичность, чем ионы серебра. Полученные результаты были сопоставлены с данными по токсичности ионного серебра (AgNO_3), показателями для стабилизаторов и надосадочного слоя. Показатели смертности эмбрионов рыб, полученные в экспериментах с растворами стабилизаторов и надосадочной жидкостью² (Рисунок 4), сопоставимы с естественной гибелью особей в контрольном опыте (инкубационная среда). Тестируемые растворы стабилизаторов и надосадочного слоя имели концентрации, близкие к точке, отвечающей 100% гибели эмбрионов рыб в растворах плоских НЧ серебра.

² Содержание серебра в надосадочном слое не превышает 0,02 мкг/л.

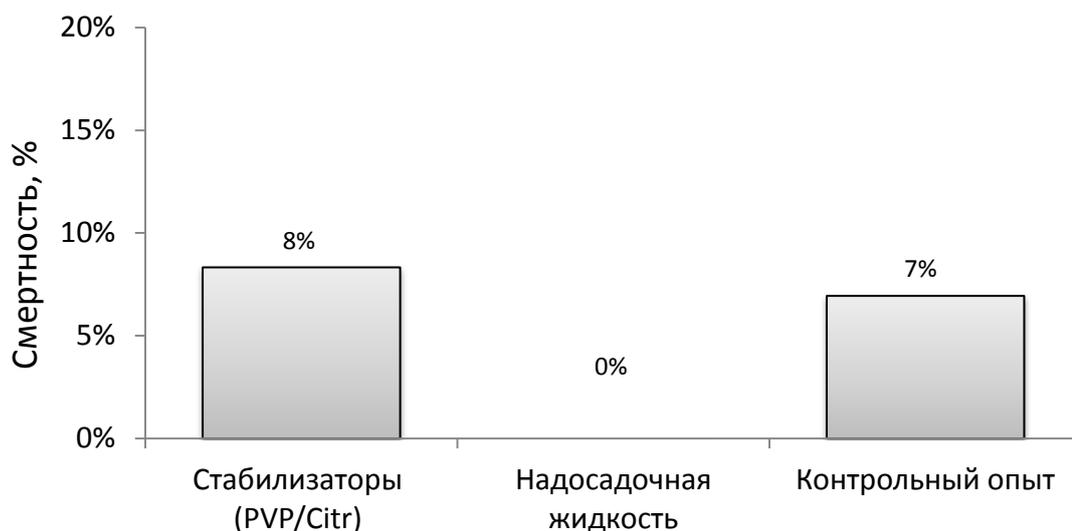


Рисунок 4. Показатели смертности эмбрионов рыб *Danio rerio* в растворе стабилизаторов, в надосадочном слое жидкости и в контрольном опыте.

Все суспензии НЧ серебра оказывали более выраженный токсический эффект у эмбрионов рыб по сравнению с ионной формой серебра. При этом нанопластины проявляли более выраженный токсический эффект, чем сферические частицы. Более высокую активность нанопластин Ag можно объяснить, сравнительно высокой концентрацией координационно-ненасыщенных атомов серебра, расположенных на ребрах и вершинах нанопластин, и которые могут являться центрами активации свободных радикалов и образования активных форм кислорода, способных оказывать высокое токсическое действие в отношении биологических тканей, а также нарушать биологические процессы, протекающие в живых организмах.

Процент гибели эмбрионов рыб в растворе стабилизаторов и в контрольном эксперименте существенно не отличаются, 8 и 7%, соответственно, а смертность составляет менее 10%, что практически соответствует допустимой естественной гибели эмбрионов. Если считать, что растворы стабилизаторов не оказывают существенного влияния на развитие икры, то можно предположить, что смертность в популяции вызвана, главным образом, соединениями серебра, находящимися в растворе. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что наличие наноразмерных частиц серебра оказывает сильное токсическое действие на процессы эмбриогенеза. При этом серебряные нанопластины проявляют больший токсический эффект, чем сферические НЧ серебра.

Влияние стабилизирующего вещества на жизнеспособность зародышей рыб

В работе были изучены несколько суспензий НЧ серебра с одинаковыми стабилизаторами и с разной концентрацией стабилизирующего агента, суспензии серебряных

НЧ с разными стабилизаторами и разные НЧ на основе серебра, стабилизированные одинаковым ПАВ.

Токсичность растворов чистых стабилизаторов была проанализирована в отдельном эксперименте. В Таблице 5 приведены суммарные результаты по токсичности растворов чистых стабилизаторов и результаты по токсичности серебряных НЧ с такой же концентрацией стабилизирующих веществ.

Таблица 5. Экспериментальные данные по токсичности стабилизирующих веществ

Наночастицы	Конц.(стаб.) в растворе 1 мг/л по серебру	Тестируемая конц. (стаб.)	Смертность, %	Данные для р-ров (НЧ) с аналогич. конц. (стаб.), %
Ag_I	10 мг/л	10 мг/л	100	100
Ag_II	2 мг/л	2 мг/л	98,5	67
Ag_III	1 мг/л	2 мг/л	100	100
Ag_III	0,2 мг/л	0,2 мг/л	12,5	10
Ag_IV	12 мг/л	12 мг/л	100	100
Ag_IV	5 мг/л	5 мг/л	3,3	58
Ag_V	2 мг/л	2 мг/л	62,5	10
Ag_V	2 мг/л	8 мг/л	100	100
AgxAgCl_V	2 мг/л	2 мг/л	62,5	98
AgxAgCl_V	2 мг/л	8 мг/л	100	100

Несмотря на то, что была выявлена значительная токсичность стабилизирующих компонентов, нет причин исключать участие НЧ серебра в механизме токсичности для *Danio rerio*. Стоит отметить, что НЧ могут понижать токсичность стабилизатора, что может быть вызвано прочной адсорбцией стабилизатора на поверхности НЧ серебра. Это было показано на примере НЧ серебра, стабилизированных такими веществами, как хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил] аммония и талловый амфополикарбоксихлоридат (Ag_II и Ag_V соответственно).

Основываясь на данных по токсичности стабилизаторов и коллоидных растворов серебра, есть основания предполагать, что при наличии органического стабилизатора, обладающего токсическими свойствами, в растворе, содержащем НЧ серебра, может происходить комбинированное токсическое воздействие на биологический объект, как от НЧ серебра, так и от стабилизирующего вещества. Результаты токсических тестов для суспензий НЧ серебра и растворов стабилизаторов приводят к выводу, что возможны три варианта влияния стабилизатора на токсичность НЧ серебра: (1) - токсичность определяется наличием соединений серебра в растворе с неактивным стабилизатором (Ag_IV), (2) - токсичность

зависит от наличия стабилизатора (Ag_III) и (3) - имеет место смешанное воздействие НЧ серебра и стабилизатора (Ag_V).

В Таблице 5 приведены суммарные результаты определения токсичности НЧ серебра разной формы, выраженной параметром LC₅₀, в присутствии разных стабилизаторов.

Таблица 5. Результаты расчетов токсичности НЧ серебра в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*

Наночастицы	LC ₅₀ мг/л	Коэффициент корреляции	95% доверительный интервал
Ag_I	0,219	0,993	0,216 – 0,302
Ag_II	0,956	0,998	0,932 - 0,981
Ag_III (1 мг/л)	1,328	0,973	1,248 - 1,414
Ag_III (0,2 мг/л)	2,917	0,999	2,763 - 3,080
Ag_IV (12 мг/л)	0,515	0,999	0,511 – 0,517
Ag_IV (5 мг/л)	0,580	0,976	0,370 - 0,909
AgxAgCl_V	0,563	0,993	0,492 - 0,644
Ag_V	2,488	0,961	2,028 - 3,052
Ag_2.4 (пластины)	0,017	0,998	0,015 - 0,018
Ag_3.1 (сферы)	0,041	0,986	0,036 - 0,045
Ag ⁺ (AgNO ₃)	0,049	0,959	0,045 – 0,051

Наночастицы серебра, стабилизированные кокодипропионатом натрия (LC₅₀ = 0,515 и LC₅₀ = 0,580 мг/л для растворов с низкой и высокой концентрациями стабилизатора) и сульфэтоксилатом додеканола (LC₅₀ = 0,219 мг/л) показали наибольшую токсичность, по сравнению с другими НЧ серебра, стабилизированными разными ПАВ. Значение полулетальной концентрации для нанокompозита на основе серебра имеет близкое значение LC₅₀ = 0,563 мг/л. Частицы Ag_III оказались одними из наименее токсичных (LC₅₀ = 1,328 и LC₅₀ = 2,917 мг/л, для растворов с низкой и высокой концентрациями хлорида полигексаметилен-бигуанидина).

Все исследуемые растворы оказывали существенное токсическое воздействие на тестируемые организмы. При этом токсический эффект растворов НЧ серебра с разными стабилизаторами оказался, как правило, меньше по сравнению с показателями для нитрата серебра. Напротив, частицы с нейтральными стабилизаторами (PVP/Cit) оказывали сопоставимый и даже более выраженный эффект на эмбрионы рыб. Для всех растворов наблюдалась зависимость показаний по смертности эмбрионов и скорости выклева из оболочки от концентрации НЧ серебра. Типичными морфологическими отклонениями у выживших особей были сколиоз, укороченное тело, замедленный выход из оболочки и увеличение перикардального пузыря.

При сопоставлении данных с размерными характеристиками НЧ серебра после получения и в экспериментальной среде (Рисунок 5) какой-либо закономерности выявить не удалось. Как отмечалось выше, размер НЧ имеет определённое значение в экотоксичности, но не может выступать в качестве основной токсикологической характеристики воздействия НЧ на окружающую среду.

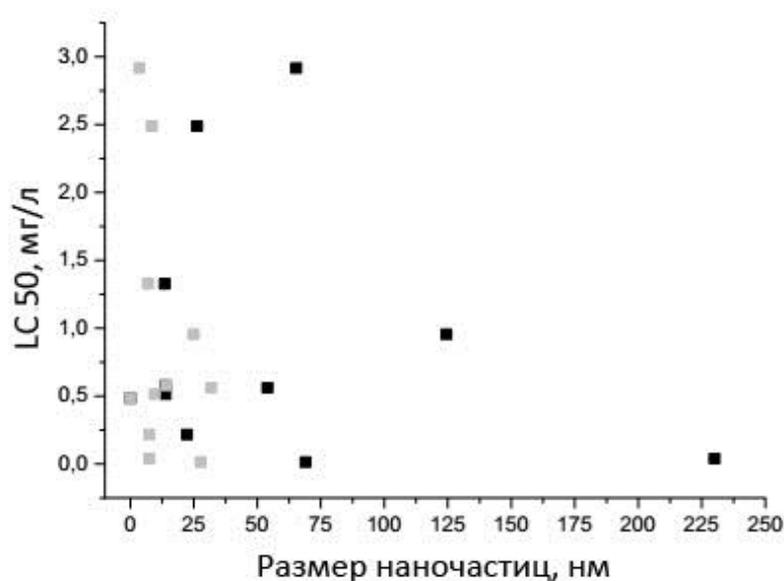


Рисунок 5. Изменение показателя токсичности наночастиц серебра LC_{50} в отношении эмбрионов *Danio rerio* в зависимости от исходного размера наночастиц (■) и их размера в инкубационной среде (□).

Полученные в ходе экспериментов данные по токсичности НЧ для гидробионтов дают основания предполагать, что токсический эффект суспензий НЧ серебра зависит, главным образом, от химического состава НЧ, ζ -потенциала поверхности, формы НЧ, природы стабилизирующего вещества и концентрации стабилизатора.

Моделирование токсического действия неорганических наночастиц

Для математического моделирования использовали экспериментальные данные, опубликованные в научной литературе. Важно отметить, что при работе с литературными источниками нас интересовали данные по токсичности НЧ не только металлов, но и оксидов металлов (Fe, Ag, Pd, Ni, TiO_2 , ZnO, CuO и другие). Были разработаны 11 классификационных и 5 регрессионных моделей с использованием встроенных в базу данных дескрипторов и физико-химических свойств НЧ, а также размера и формы НЧ.

При разработке моделей были использованы следующие методы машинного обучения:

Метод связанных «нейронных сетей» (Associative Neural Network - ASNN). Этот метод сочетает в себя группу нейронных сетей с прямой связью. Метод k-ближайших соседей.

Данный метод предсказывает активность или класс выбранной модели путем поиска наиболее распространенного среди ближайших к образцу k -соседних значений. Метод WEKA-RF (алгоритм «случайного леса»). Этот метод является реализацией метода WEKA случайного дерева решений.

При оценке корректности регрессионных моделей использовали следующие значения: среднеквадратичное отклонение σ^2 , среднее абсолютное отклонение S , квадрат коэффициента корреляции R^2 и межвалидационный коэффициент q^2 . Коэффициенты R^2 и q^2 характеризуют степень отличия расчетных значений от экспериментальных величин. Чем ближе значение R^2 к единице, тем лучше модель описывает экспериментальные данные. В соответствии с общими рекомендациями QSAR модели, для которых $q^2 > 0,5$, относят к моделям с приемлемой прогностической способностью.

Регрессионные модели. Были разработаны модели регрессии с применением метода связанных «нейронных сетей» (ASNN) для различных выборок данных. Коэффициенты q^2 для обучаемых наборов находились в пределах 0,69-0,79. Значение q^2 для тестовых выборок варьировались от 0,70 до 0,79. Одна из моделей была разработана только по физико-химическим и другим свойствам НЧ без использования дескрипторов. Для построения модели были взяты следующие характеристики НЧ: химический состав, средний размер НЧ, свойства поверхности НЧ (заряд, стабилизатор, удельная поверхность) и форма НЧ. Остальные модели были получены на базе стандартных расчетных дескрипторов и свойств НЧ.

Классификационные модели. Было разработано 11 моделей QSAR, дифференцирующих НЧ на низко- и высокотоксичные категории. В качестве дескрипторов были использованы следующие показатели: химический состав НЧ, средний размер НЧ, свойства поверхности, кристаллическая структура, форма НЧ и условия проведения эксперимента.

Наилучшие результаты были получены методом WEKA-RF. Три модели были разработаны при использовании исключительно физико-химических свойств НЧ. Точность для обучающих выборок находилась в интервале 76-100%, для проверочных выборок точность варьировалась в пределах 78-100%.

Исходя из статистических параметров разработанных математических моделей токсичности НМ, можно заключить, что использование физико-химических свойств и основных характеристик НЧ и методов QSAR позволяет достаточно успешно описывать токсические свойства НЧ. Результаты внутренней и внешней проверки построенных моделей

QSAR показали, что они обладают не только хорошей надежностью, но также стабильностью и прогностической способностью.

Сравнение статистических параметров рассмотренных моделей, приводит к выводу, что классификационные модели дают лучшие результаты, чем модели регрессии и их применение имеет определенное преимущество при оценке токсичности новых НЧ.

Несмотря на то, что было получено несколько моделей, описывающих токсичность НЧ, разработанные с использованием только свойств и физико-химических характеристик НЧ и условий экспериментов, для более достоверного прогнозирования токсичности НМ с применением моделей QSAR необходимо использовать как экспериментальные характеристики НЧ, так и расчетные дескрипторы. Результаты расчетов позволяют выделить следующие свойства НЧ, которые определяют их токсическое воздействие на живые организмы - это их размерные характеристики (средний диаметр и размер агрегатов), форма частиц и свойства поверхности (ζ -потенциал, площадь поверхности) и природа стабилизатора. Предложенный подход может применяться для оценки токсичности новых НЧ на ранних стадиях разработки НМ.

V. РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Исследованы физико-химические характеристики НЧ серебра, отличающихся формой и размерами, в частности 9 образцов НЧ плоской и сферической формы, стабилизированные PVP и цитратом натрия, формиатом и полифосфатом натрия, и 6 образцов НЧ серебра с различными стабилизирующими ПАВ.

2. Разработаны оригинальные и адаптированные методики оценки токсичности НМ с использованием планарий и моллюсков.

3. Изучена токсичность коммерческих НЧ серебра в отношении пяти видов гидробионтов: водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, двустворчатые моллюски *Unio tumidus*, плоские черви планарии (*Jirardia tigrina*), пресноводные рачки *Daphnia magna*, эмбрионы рыб *Danio rerio*.

4. Проанализировано влияние размера, формы НЧ и природы стабилизатора на токсические показатели НЧ серебра в отношении эмбрионов *Danio rerio*.

5. Предложено 11 новых моделей QSAR, позволяющих дифференцировать НЧ на низко- и высокотоксичные категории, с использованием литературных и собственных экспериментальных данных. Наилучшие результаты получены методом WEKA-RF. Точность для обучающих выборок составляет 76% - 100%, для проверочных выборок точность варьировалась в пределах 78-100%.

6. Построено пять регрессионных моделей с применением метода связанных «нейронных сетей» (ASNN). Коэффициенты q^2 для обучаемых выборок составили 0,69 - 0,79. Значения q^2 для тестовых выборок варьировались от 0,70 до 0,79. Для построения одной из моделей использовали только характеристики НЧ: химический состав, средний размер, свойства поверхности частиц (заряд, стабилизатор, удельная поверхность) и форма частиц. Остальные модели были получены на базе стандартных расчетных дескрипторов и свойств НЧ.

VI. ВЫВОДЫ

1. В работе установлено, что биологическая активность суспензий наночастиц серебра существенным образом зависит от структурно-химических характеристик НЧ, в частности, размера НЧ, ζ -потенциала их поверхности, а также природы стабилизатора суспензии. Серебряные НЧ, стабилизированные поливинилпирролидоном и цитратом натрия, обладают более высокой токсичностью, по сравнению с ионами серебра. В то же время, токсичность сферических НЧ серебра в суспензиях с ПАВ-стабилизаторами заметно уступает токсичности ионов Ag.

2. Впервые экспериментально обнаружена зависимость токсических свойств НЧ серебра от их формы. Показано, что плоские наночастицы серебра проявляют более высокую биологическую активность, чем сферические наночастицы, даже меньшего размера в отношении эмбрионов рыб. Средние значения полуметалетальной концентрации LC_{50} в этих опытах составили для плоских и сферических наночастиц 0,016 и 0,041 мг/л, соответственно.

3. Впервые показано, что токсичность НЧ серебра зависит как от типа используемого соединения серебра, так и от природы стабилизатора суспензии. Между тем, не исключен и синергический эффект совместного действия наночастиц серебра и стабилизирующего компонента.

4. Установлены закономерности токсического воздействия суспензий НЧ серебра на некоторые гидробионты. Найдено подтверждение гипотезы о возможном механизме токсического действия НЧ серебра, который включает проникновение НЧ в клетки живых организмов, а также процессы окисления и радикалообразования, приводящие к нарушению нормального функционирования клеток и к разрушению находящихся в них органических макромолекул.

5. Показана возможность использования физико-химических и других характеристик НЧ, таких, как размер и форма НЧ серебра, ζ -потенциал поверхности наночастиц, а так же природа стабилизатора для описания токсической активности суспензий серебра и построения математических моделей, адекватно описывающих их биологическую активность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kustov, L., Tiras, K., Al-Abed, S., **Golovina, N.**, Ananyan, M. Estimation of the toxicity of silver nanoparticles by using planarian flatworms // ATLA Alternatives to Laboratory Animals. – 2014. – V. 42 №1. – P. 51–58.
2. **Golovina, N. B.**, Kustov, L. M. Toxicity of metal nanoparticles with a focus on silver // Mendeleev Communications. – 2013. –V. 23, № 2. –P.59-65.
3. **Abramenko, N.B.**, Kustov, L.M. Study of ecotoxicity of silver nanoparticles using algae // Russ. J. Phys. Chem. - 2016. – V. 90.№ 12. – P. 2217–2220.
4. **Abramenko, N.B.**, Kustov, L.M. Study of ecotoxicity of silver nanoparticles using Daphnids // Russ. J. Phys. Chem. – 2016. – V. 90.№ 12. – P. 2450–2453.
5. **Abramenko, N.**, Peijnenburg, W., Kustov, L. Toxicity of Me and MeO nanoparticles: experiment and QSAR modeling // International Symposium "Nanostructured adsorbents and catalysts", Moscow, Russia, 2016. Book of abstracts. – P. 14.
6. **Abramenko, N.**, Hua, J., Krysanov, E., Peijnenburg, W., Kustov, L. Toxic effects of differently shaped nanoparticles (ZnO and Ag) to zebrafish embryos (Danio Rerio) // The 3rd International Symposium "Nanomaterials and Environment", Moscow, Russia, 2016. Book of abstracts. – P. 30.
7. Kovalishyn, V., Peijnenburg W., Kopernyk Ir., **Abramenko N.**, Metelytsia L. QSPR modelling for predicting toxicity of nanomaterials // NANOCON 2015. Brno, Czech Republic, 2015. Book of abstracts. – P. 1–6.
8. Kopernyk, I., Charochkina, L., Kovalishyn V., **Abramenko N.**, Peijnenburg W., Metelitsya L. Prediction of toxicity for metal oxide nanoparticles // Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2015), Toulouse, France, 2015. Book of abstracts. – P. 71.
9. **Golovina, N.**, Zherebin, P., Krutyakov, Yu, Krysanov, E., Kustov, L. Role of stabilization and stabilizer on toxicity of colloidal silver for Danio rerio // The 2nd International Symposium "Nanomaterials and Environment", Moscow, Russia, 2015. Book of abstracts. – P. 57.
10. **Golovina, N.**, Demidova, T., Ordzenikidze, K., Krysanov, E. Nanoparticles penetration through zebra fish egg membrane at the stage of perivitelline space formation // International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies. SENN 2015 Conference, Helsinki, Finland, 2015. Book of abstracts. – P. 83.
11. **Golovina, N.**, Demidova, T., Abkhalimov, E., Zherebin, P., Krutyakov, Yu, Krysanov, E., Kustov, L. Acute toxicity of silver nanoparticle for zebrafish (Danio rerio embryos): effect of nanoparticle stabilization and physicochemical properties // International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies. SENN 2015 Conference, Helsinki, Finland, 2015. Book of abstracts. – P. 46.

12. **Головина, Н.Б.** Токсичность наночастиц: моделирование и экспериментальное исследование на гидробионтах // Международная научная конференция «Ломоносов 2014», Москва, Россия, 2014. Электронный ресурс ISBN 978-5-317-04715-3
13. **Golovina, N.,** Kustov, L., Tetko I. Modeling nano-toxicity: latest results and future perspective // ECO Final Conference 2013, Prien at Lake Chiemsee, Bavaria, Germany, 2013. Book of abstracts. – P. 64.
14. **Golovina, N.,** Tetko I. Modeling of toxicity of nano-particles using the OCHEM // International Symposium "Nanomaterials and Environment", Moscow, Russia, 2013. Book of abstracts. – P. 14.
15. **Golovina, N.,** Novotarskui, S., Sushko, I., Kustov, L., Tetko I. Modeling toxicity of nanoparticles using Online Chemical Modeling Environment //Conference Munich Interact 2012. Munich, Germany, 2012. Book of abstracts. – P. 146.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НЧ – наночастицы

НМ – наноматериалы

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ИС (EW) – инкубационная среда (egg's water)

LC₅₀ – полуметальная концентрация вещества, при которой гибнет 50% популяции

DLS (dynamic light scattering) – метод динамического светорассеяния

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия

Гидробионты – водные организмы

QSAR (quantitative structure activity relationship) – количественная взаимосвязь структуры вещества с его свойством или активностью

ASNN (associative neural network) – метод ассоциативных «нейронных сетей»

kNN (k-nearest neighbors) - Метод ближайших k соседей

WEKA (waikato environment for knowledge analysis) - совокупность алгоритмов машинного обучения для анализа данных

WEKA-RF (random forest) - алгоритм «случайного леса» в среде WEKA