



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ*

В. А. Богатырев

Институт биологии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

Изложены результаты экспериментальной работы студентов и аспирантов базовой кафедры биофизики ФНП СГУ и лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН по выявлению потенциальной опасности применения плазмонно-резонансных наноматериалов в медико-биологических исследованиях. Исследования проводились на разработанном в рамках данной темы программно-приборном комплексе спектрофотометрических и микроскопических измерений, позволяющих оценить жизнеспособность микроводорослей *Dunaliella salina* и определить токсичность компонентов инкубационной среды.

Ключевые слова: Нанотоксикология, наночастицы, спектрофотометрия, флуоресцентная микроскопия.

1. Физические основы эксперимента

Первоначально результаты этой работы были представлены на научной конференции «Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы» 23–24 сентября 2014 г. в Волгограде, организованной научно-исследовательским институтом гигиены, токсикологии и профпатологии Федерального медико-биологического агентства. Конференция по нанотоксикологии проводилась в этом профильном институте на подобную тему впервые.

Нанотоксикология – достаточно молодая наука, которая занимается изучением рисков для здоровья человека, других живых организмов и окружающей среды, связанных с производством и применением нанотехнологической продукции – наноматериалов. Под наноматериалами принято понимать объекты, геометрические размеры которых хотя бы в одном измерении попадают в диапазон 1...100 нм. Строго говоря, под это определение подпадает поверхность всех объектов как таковая, поскольку она имеет «толщину» нанометровых размеров и свойства атомов и молекул поверхностного слоя отличаются от таковых в глубинных слоях. Объяснить причину этого различия достаточно просто – поверхностные молекулы взаимодействуют как с молекулами внутренних слоев, так и с окружающим пространством. Эти различия тем сильнее, чем больше разница свойств материала и окружения. Поэтому

*Статья написана по материалам лекции, прочитанной на Школе «Нелинейные дни в Саратове для молодых – 2014». Саратов, 17–21.10.2014, 26–27.11.2014

в определение наноматериалов вводится уточнение, что под этим термином следует понимать такие объекты, которые из-за размеров нанометрового диапазона имеют принципиально новые качества. По сути основным отличием наноразмерных объектов от массивных (объемных) является соотношение общей массы и суммарной поверхности, называемое удельной поверхностью. Так, например, удельная поверхность наночастиц золота достигает полутора сотен м²/г, при том что плотность золота почти в 20 раз больше, чем у воды. Это очевидно, поскольку при измельчении (диспергировании) с уменьшением размера частиц суммарная поверхность прямолинейно возрастает, так как поверхность и объем каждой частицы убывают как квадрат и куб линейного размера соответственно, а количество частиц возрастает в третьей степени. Подробно о свойствах золотых наночастиц можно прочитать в монографии авторов [1]. Не будем подробно останавливаться на механизмах формирования таких наночастиц и технологиях их производства, заметим лишь, что зачастую технологический процесс включает использование весьма токсичных материалов. Одним из таких веществ, придающих анизотропию формы стержневым или звездообразным частицам, является катионное поверхностно-активное вещество (ПАВ) – цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ). Цетил – это тривиальное название додецильного (12-звенного) линейного алифатического радикала. С другой стороны, наночастицы часто используют как носители лекарственных соединений, предназначенных подавлять злокачественные образования, по возможности не затрагивая нормальные клетки.

Суть метода «тест-системы» заключается в выращивании (культивировании) микроводорослей в 96 луночных планшетах в средах с переменными рядами концентраций токсикантов – продуктов нанотехнологического производства. Токсичность оценивается как изменение скорости роста популяции микроорганизмов относительно контроля (без загрязнителя), измеряемое по поглощению света (абсорбции) с помощью планшетного спектрофотометра (ридера). Адекватность фотометрических измерений подтверждается подсчетом живых и мертвых клеток на флуоресцентных микроскопических изображениях.

2. Эксперимент

Необходимость проведения научно-исследовательских работ токсикологического направления возникла в ходе выполнения основной темы «Многофункциональные наноматериалы на основе металлических и композитных наночастиц: синтез, характеристика и биомедицинские применения» лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН.

2.1. Экспериментальные материалы. На рис. 1 [2] приведены примеры различных наночастиц, синтезируемых в ИБФРМ РАН. Они уже сейчас активно используются во многих научных лабораториях России и за рубежом. Наибольшее распространение получили наночастицы коллоидного золота различных форм, размеров и поверхностной функционализации, вследствие простоты получения, низкой собственной токсичности золота и возможности настройки положения плазмонного резонанса¹. Особый интерес в нанотоксикологии представляет серебро, как вещество с существенно большей, чем у золота, растворимостью, заметно увеличивающейся

¹Плазмонный резонанс – оптическое свойство благородных металлов, обусловленное коллективным движением электронов проводимости.

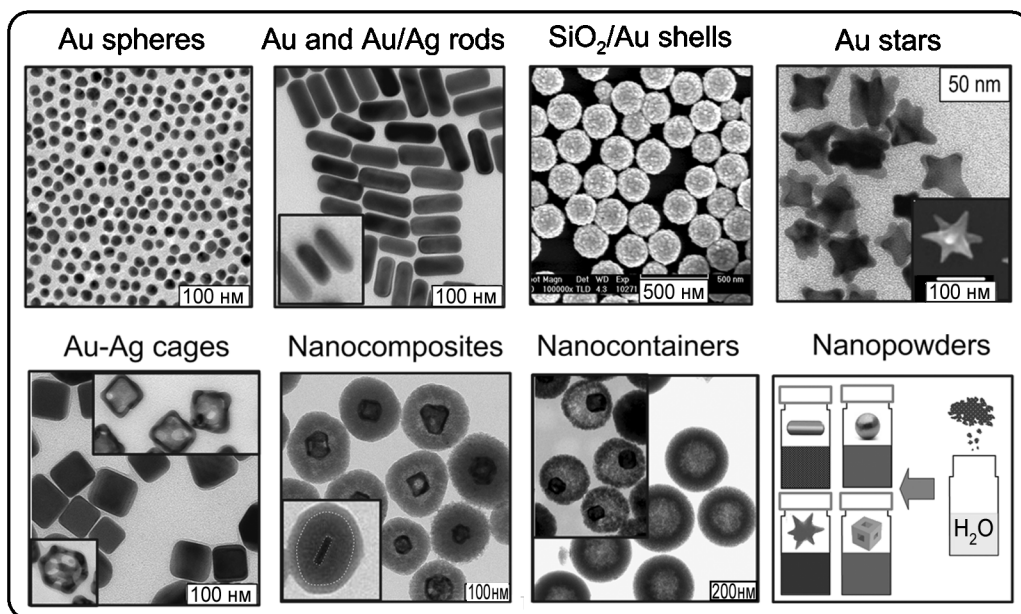


Рис. 1. Примеры плазмонных наночастиц [2]: 16-нм частицы коллоидного золота; золотые наностержни и золотые наностержни с серебряным покрытием (на вставке); SiO_2/Au нанооболочки; золотые нанозвезды; серебряные нанокубики и золотосеребряные наноклетки (на вставке); наноклетки, содержащие плазмонное ядро и мезопористую оболочку; полые мезопористые силикатные сферы и нанопогремушки, содержащие плазмонные наночастицы в полости; плазмонные нанопорошки различных типов частиц

при попадании в виде наночастиц в клетку в условиях кислой среды лизосом². Благодаря этому свойству серебряные наночастицы проявляют так называемый эффект «тroyанского коня».

Полное название разрабатываемой нами темы нанотоксикологического направления – «Колориметрическая тест-система определения жизнеспособности микроводорослей *Dunaliella salina* при воздействии токсикантов нанотехнологического производства». Почему именно *D. salina* была выбрана в качестве тест объекта для выявления токсичности наноматериалов, предназначенных для медико-биологических применений? *D. salina* или дуналиелла солоноводная – вид одноклеточных зеленых водорослей, обитающих в гиперсоленых водоемах. Это единственное растение, не имеющее плотной клеточной стенки и схожее в этом отношении с клетками животных. Чрезвычайно интересна история открытия, изучения и современного использования этих микроводорослей, вызывающих красное цветение воды. Настоятельно рекомендую ознакомиться с этим вопросом самостоятельно [3].

2.2. Тест-система. На рис. 2 показаны элементы тест-системы. Весь эксперимент проводят в специальном микропланшете с 96 (12×8) цилиндрическими лунками объемом 400 мкл каждая (рис. 2, а). Первоначально создается концентрационный ряд токсикантов, как правило, из 5 или 11 последовательных разведений. Последние в ряду лунки без токсиканта используют как контрольные. Для статистического учета разброса данных ряды дублируют или триплицируют. Затем во все лунки вносят одинаковое количество водорослей и измеряют начальную оптическую плотность (D_0) суспензии на специальном планшетном спектрофотометре –

²Лизосомы – органониды клетки, главной функцией которых является внутриклеточное пищеварение.

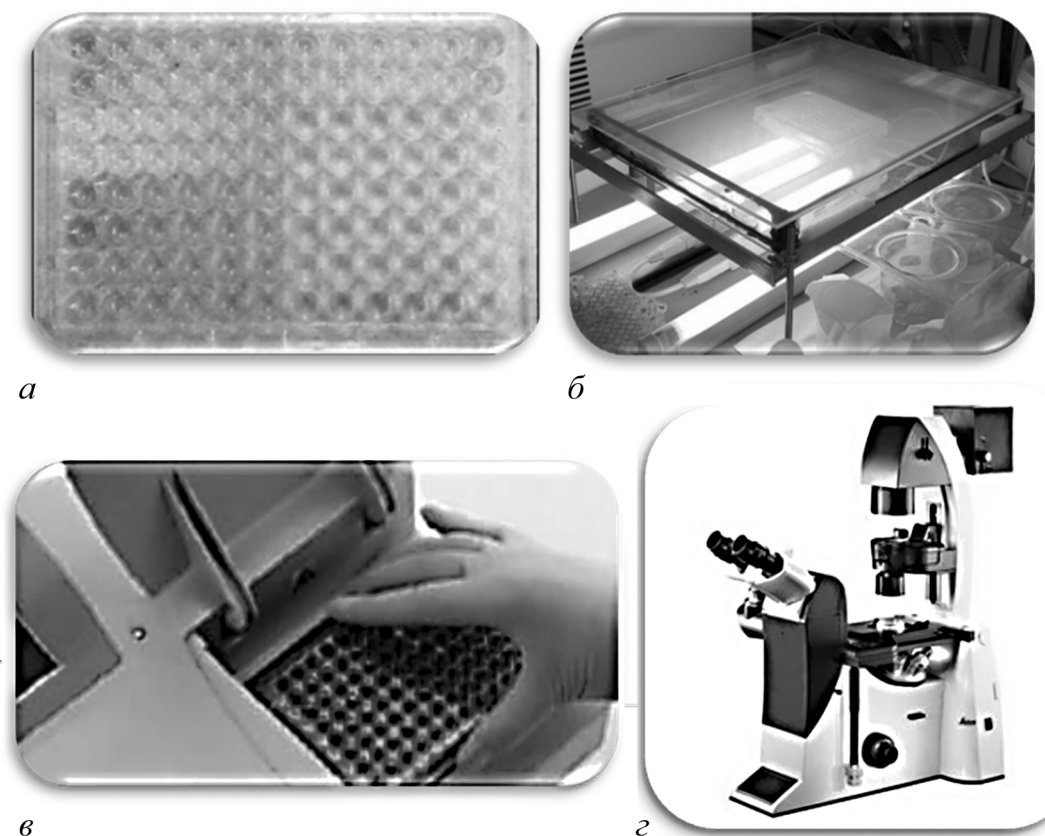


Рис. 2. . Микропланшетная тест-система: *а* – 96-луночный микропланшет, *б* – факторостатная камера, *в* – планшетный спектрофотометр (ридер), *г* – инвертированный флуоресцентный микроскоп ридере (рис. 2, *в*). Ридер имеет набор светофильтров с полосами пропускания во всем видимом диапазоне света.

Затем планшеты помещают в факторостатную камеру (рис. 2, *б*), поддерживающую постоянную температуру и освещение. После 24-часовой инкубации планшеты вынимают из камеры и регистрируют изменение оптической плотности в каждой лунке, записывают их как D_{24} . Вслед за этим планшеты помещают на предметный столик инвертированного микроскопа (рис. 2, *г*) и получают изображения центра дна лунок в режиме флуоресценции. По изображениям подсчитывают количество живых и мертвых клеток. Живые клетки флуоресцируют красным светом, мертвые – голубым. Планшеты возвращают в факторостатную камеру и через 48 ч повторяют фотометрические и микроскопические измерения. В принципе, эксперимент можно проводить сколь угодно долго, однако 48 ч – тот период, когда проявляется так называемая острая токсичность.

Для реализации поставленной задачи необходим объект, который позволял бы оперативно определять потенциальную опасность для клеток человека и животных применения наночастиц, подобных изображенным на рис. 1. Важно, чтобы такое применение не вызывало морфофункциональные изменения клеток. В настоящее время существуют технологии выращивания клеток, тканей и даже органов *in vitro*³.

³In vitro – (лат. «в стекле») это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» вне живого организма; in vivo – (лат. «в живом»), то есть «внутри живого организма» или «внутри клетки».

Такие технологии называются «методом культуры клеток и тканей». Поддержание культуры животных клеток – процесс достаточно сложный и дорогой, поскольку необходимо строго соблюдать стерильность и создавать условия среды, близкие к естественным, то есть *in vivo*.

2.3. Методика оценки жизнеспособности микроводорослей. Для оценки жизнеспособности клеток существует несколько стандартных приемов. Они связаны с применением различных красителей, которые либо по-разному (дифференциально) окрашивают живые и мертвые клетки, либо изменяют свой цвет под действием внутриклеточных ферментов. В случае плазмонно-резонансных частиц, которыми являются наночастицы золота и серебра, эти методы также имеют ряд ограничений. Теме применения коллоидного золота в световой микроскопии была посвящена лекция на школе-конференции «Нелинейные дни в Саратове для молодых – 2011» [4]. Для примера на рис. 3 приведена микрофотография животных клеток линии SPEV-2, инкубированных с наночастицами серебра довольно высокой концентрации $[Ag] = 50$ мг/л. Темные пятна в цитоплазме клеток – лизосомы с наночастицами серебра.

Кроме очень высокого накопления серебра в цитоплазме клеток, никаких патологических изменений формы и состава клеток в этом эксперименте не наблюдается. Таким образом, нам нужен был объект, который без дополнительных красителей сам бы сообщал о своем «самочувствии» каким-либо легко регистрируемым изменением. На рис. 4 приведены микрофотографии клеток водоросли *D. salina* в различных режимах микроскопирования. На передней (апикальной) части клетки видны два жгутика, благодаря которым дуналиелла активно передвигается (рис. 4, а).

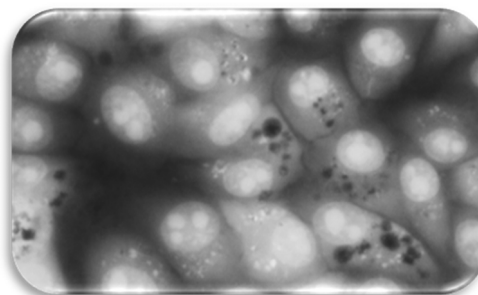


Рис. 3. Микрофотография животных клеток SPEV-2, инкубированных с наночастицами серебра $[Ag] = 50$ мг/л. Флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым



а



б

Рис. 4. Микрофотография микроводоросли *D. salina* в проходящем свете (а) и при флуоресцентном освещении (б)

В принципе, подвижность клеток – важный физиологический показатель, который

вполне может быть использован как токсикометрическая характеристика [5]. Однако в данной работе нас больше интересует изменение цвета, поскольку эта характеристика качественно может быть оценена вообще без применения приборов.

Хорошо известно, что зеленый цвет растений обусловлен фотосинтетическим пигментом хлорофиллом. При освещении синим светом хлорофилл флуоресцирует красным, поэтому на флуоресцентных микрофотографиях мы видим яркие пятна, занимающие почти весь объем клеток (рис. 4, б). Это бокаловидные хлоропласты. В углублении хлоропласта в апикальной части находится ядро клетки. В нормальных условиях все клетки имеют примерно одинаковые размеры (около 8 мкм в длину) и равное содержание хлорофилла. Поэтому определять количество клеток можно, измеряя поглощение света хлорофиллом (абсорбцию). Стандартно содержание хлорофилла в растениях определяют по абсорбции спиртовых или ацетоновых экстрактов. Можно извлекать хлорофилл другим органическим растворителем – диметилсульфоксидом, в этом случае экстракт менее подвержен окислению и фотодеструкции (обесцвечиванию).

2.4. Результаты спектрографических измерений Спектр поглощения суспензий микроводорослей *D. salina* обусловлен главным образом содержанием хлорофилла А. Пики поглощения хлорофилла А находятся в области 430 и 670 нм. Однако благодаря наличию белково-пигментных комплексов (фотосистем) спектры поглощения зеленых растений значительно уширены и смещены.

На рис. 5 приведены спектры поглощения клеточной суспензии *D. salina* в культуральной среде в конце логарифмической стадии роста и диметилсульфоксидного экстракта этих же клеток. Спектры получены на двух различных приборах – прецизионном двухлучевом спектрофотометре Specord M 40 (Karl Zeiss Jena, Германия) и планшетном ридере Multiskan Ascent (США).

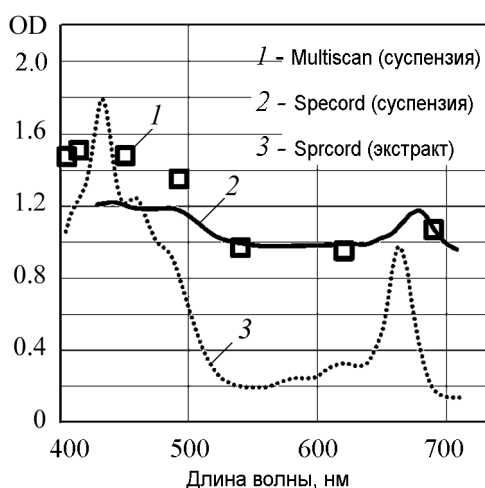


Рис. 5. Спектры поглощения (OD) суспензии *D. salina*, полученные на спектрофотометре Specord M 40 (сплошная линия) и Multiskan Ascent (квадраты); пунктирная линия – диметилсульфоксидный экстракт хлорофилла

Значками (квадратами) показаны значения оптических плотностей планшетного ридера Multiskan в полосах соответствующих светофильтров.

Из рис. 5 следует, что пики поглощения хлорофилла лежат в областях между стандартными светофильтрами планшетного ридера Multiskan Ascent. Наиболее близко к пику поглощения суспензии водорослей находится светофильтр 690 нм. Несмотря на существенные расхождения данных в коротковолновой области спектра, можно отметить, что значения оптических плотностей в полосах пропускания светофильтров 540, 620 и 690 нм, регистрируемые на разных спектрофотометрах, довольно близки. С учетом того, что при увеличении количества лизированных⁴ клеток

⁴Лизис – процесс гибели клеток, сопровождаемый вытеканием наружу внутриклеточного содержимого.

возрастает вклад светорассеяния в общее ослабление света клеточной суспензией, полоса фильтра 690 нм была выбрана как основная для построения графиков зависимости изменения оптической плотности от концентрации токсикантов. В целом наши результаты хорошо согласуются с данными спектроскопических измерений суспензий и ацетоновых экстрактов *D. tetrio* [6].

Планшетный вариант измерения жизнеспособности микроводорослей по изменению оптической плотности суспензии в области красного максимума поглощения хлорофилла позволяет избежать процедуры экстракции этого пигмента и оценивать кинетику его фотодеструкции, сопровождающую гибель клеток. Интактные⁵ клетки сохраняют свою окраску, при этом концентрация зеленого пигмента пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. Это позволяет судить о количестве живых организмов и кинетике развития популяции.

Результат гибели клеток, регистрируемый фотометрическим способом, надежно проявляется уже через 24 часа наблюдений. В лунках, где произошла гибель клеток, взвесь обесцвечивается.

2.5. Проверка корректности фотометрических измерений. Корректность фотометрических измерений требует соблюдения условия неизменности спектральных свойств хромофоров⁶ и минимизации неконтролируемого вклада светорассеяния в общее ослабление светового потока. Для проверки микропланшетного способа измерения оптической плотности мы провели серию параллельных измерений одной и той же суспензии *D. salina* в ряду двукратных разведений культуральной средой. Результаты измерений показали практически линейную зависимость оптической плотности от степени разведения суспензии для планшетного ридера.

Для проверки выполнения условия неизменности спектральных характеристик системы были проведены эксперименты с бесцветными токсикантами: формальдегидом и перекисью водорода. Очевидно, что нулевое приращение оптической плотности должно свидетельствовать о стационарном процессе, то есть равенстве скоростей роста и гибели клеток. Превышение контрольных значений в области допороговых концентраций токсикантов (меньших, чем минимально действующие) свидетельствует об эффекте гормезиса – стимулировании роста. И наконец, отрицательные значения изменения оптической плотности свидетельствуют о превышении гибели популяции над ростом. В качестве оценочной характеристики был выбран параметр

$$\overline{\Delta D} = D_t(C) - D_0(C) / D_t(0) - D_0(0),$$

где t – время экспозиции, а C – концентрация токсиканта. По сути, параметр $\overline{\Delta D}$ отображает отношение скоростей роста опыта и контроля (без токсиканта).

На рис. 6 приведены графики зависимости изменения оптических характеристик суспензии *D. salina* от концентрации перекиси водорода в инкубационной среде при различных временах экспозиции (24 и 48 часов).

Из рис. 6, а видно, что при концентрациях более 30 мг/л приращение оптической плотности при 24- и 48-часовой экспозиции оказывается отрицательным, что говорит о более чем 50% гибели популяции. Анализ микроскопических изображений (рис. 6, б) показывает, что вплоть до концентрации H_2O_2 15 мг/л никаких достоверных отличий от контроля не наблюдается. В точке 20 мг/л отмечается достоверное увеличение количества нормально флуоресцирующих, без видимых морфологических изменений, неподвижных клеток. Следовательно, эту концентрацию

⁵Интактный – (лат. *intactus* нетронутый) неповрежденный, не вовлеченный в какой-либо процесс.

⁶Хромофоры – группы атомов, обуславливающие цвет химического соединения.

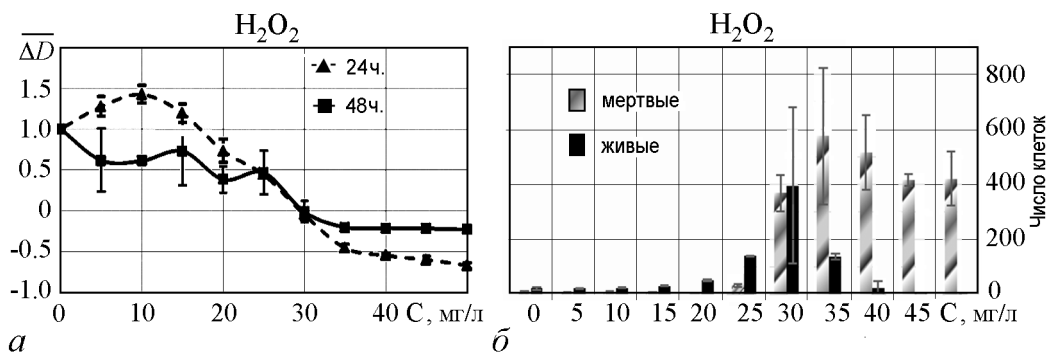


Рис. 6. Изменение относительной оптической плотности $\overline{\Delta D}$ суспензии *D. salina* в концентрационном ряду H_2O_2 (а) и количество клеток в поле зрения флуоресцентного микроскопа в фокальной плоскости дна лунки, светящихся голубым (мертвые) и красным (живые) цветом после 24-часовой экспозиции (б). $D_0 = 0.09$, $D_{24}(0) = 0.12$, $D_{48}(0) = 0.37$. Бары (планки погрешностей) показывают стандартное (среднеквадратическое) отклонение

можно считать минимальной действующей (ЛОЕС)⁷. В следующем столбце триплицированных рядов (25 мг/л) отмечается достоверное увеличение числа мертвых (без красной флуоресценции) клеток, а в лунках с концентрацией H_2O_2 30 мг/л число синих и красных клеток примерно одинаково. Вероятно, эту концентрацию следует считать медианной (LC50)⁸. Изменение оптической плотности в этой точке (см. рис. 6, а) свидетельствует о примерном равенстве скоростей гибели и роста клеток, поскольку нулевое значение приращения оптической плотности сохраняется при 24- и 48-часовой экспозиции. Суммарное количество фиксируемых клеток максимально в этой точке, и при увеличении концентрации токсиканта происходит уменьшение вплоть до полного исчезновения числа жизнеспособных клеток. При концентрации 35 мг/л (см. рис. 6, б) наблюдается максимальное количество нежизнеспособных клеток, которое при дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 несколько снижается, вероятно, вследствие лизиса.

На рис. 7 приведены фрагменты кадров регистрации изображений клеток *D. salina* после 24-часовой экспозиции с H_2O_2 различных концентраций. Изначально цветные изображения разложены на составляющие цвета (RGB) с помощью программы ImageJ [7]. Верхний ряд соответствует красному каналу, нижний – синему.

Результаты фотометрических и микроскопических измерений суспензий микроводоросли в концентрационном ряду формальдегида оказались качественно схожими с таковыми для перекиси водорода. Диапазоном действующих концентраций формальдегида можно считать 2...12 мг/л, медианное значение (LC50) примерно равно 4 мг/л.

Таким образом, определение токсического действия бесцветных поллютантов⁹ не вызывает особых проблем. Значения LC100 и LC50 можно определить по графикам спектрофотометрических измерений: LC100 соответствуют точки выхода на плато экстраполяционной кривой в области отрицательных значений, LC50 – точки пересечения с линией нулевых значений. LOEC определяются подсчетом мертвых

⁷ LOEC (lowest observed effect concentration) – одна из основных токсикометрических характеристик.

⁸ LC50 – концентрация, вызывающая половинную гибель популяции.

⁹ Поллютант – любое химическое вещество или соединение, которое находится в объекте окружающей природной среды в количествах, превышающих фоновые значения и вызывающие тем самым химическое загрязнение.

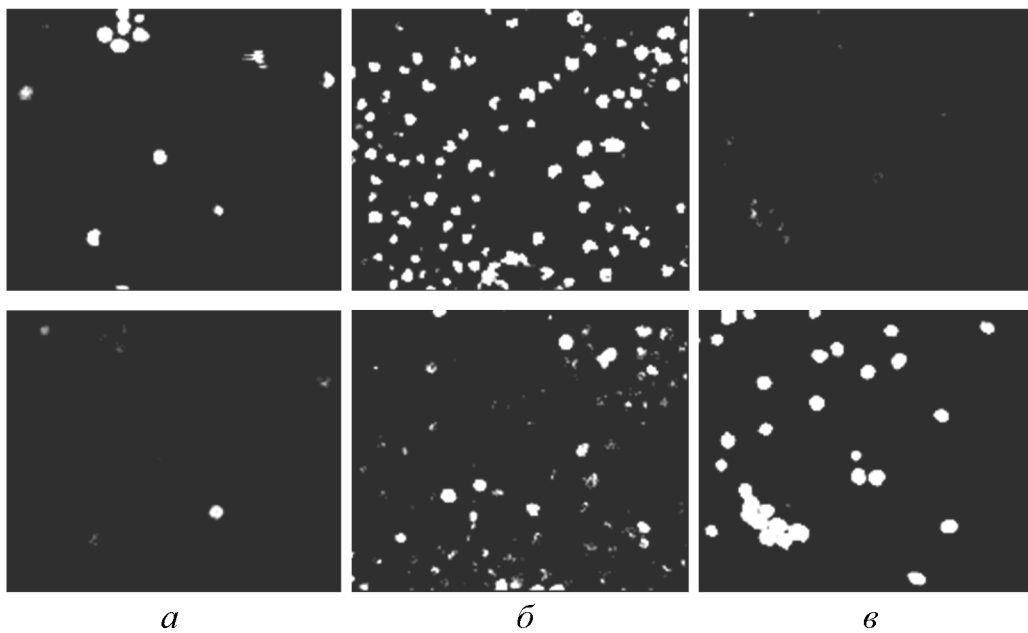


Рис. 7. Флуоресцентные микроскопические изображения фокальной плоскости дна лунок суспензий клеток *D. salina* после 24-часовой экспозиции с H_2O_2 различных концентраций: *a* – 0 мг/л, *б* – 30 мг/л, *в* – 50 мг/л. Красные – живые клетки (флуоресценция хлорофилла), голубые – мертвые клетки

клеток на выделенной площади фокальной плоскости центра дна лунки микропланшета.

2.6. Результаты экспериментов с другими препаратами. Несколько более сложный случай представляют собой препараты серебра, обладающие плазмонным резонансом металлических наночастиц и фоточувствительностью солей, что предполагает значительный вклад хроматических изменений токсиканта в абсорбцию тестируемой суспензии.

Нами были проведены эксперименты с тремя различными препаратами серебра: коллоидным серебром (КС), протеинатом серебра (ПрАг) и нитратом серебра $AgNO_3$ в среде $NaCl$. Препарат КС представляет собой незащищенный (электростатически стабилизированный) гидрозоль металлического наносеребра с размером частиц около 20 нм в диаметре. КС сохраняет свою агрегационную стабильность только в условиях низкой ионной силы при хранении в герметически закупоренных флаконах. ПрАг – коммерческий препарат оксида серебра, стабилизированного сывороточным альбумином с содержанием серебра в порошке 8.3%. Водные растворы этого препарата агрегационно и седиментационно устойчивы в широком интервале кислотности и ионной силы. Очевидно, что $AgNO_3$ в условиях 1.5 М $NaCl$ образует суспензию $AgCl$, не обладающую свойствами плазмонного резонанса и, соответственно, не поглощающую в видимой области спектра.

Результаты экспериментов с препаратами серебра показали отсутствие принципиальных отличий в интерпретации фотометрических и микроскопических данных по сравнению с таковыми для бесцветных поллютантов. При этом проявилось качественное отличие, заключающееся в том, что для препаратов серебра характерны достаточно протяженные зоны полуметальных концентраций, проявляющиеся во

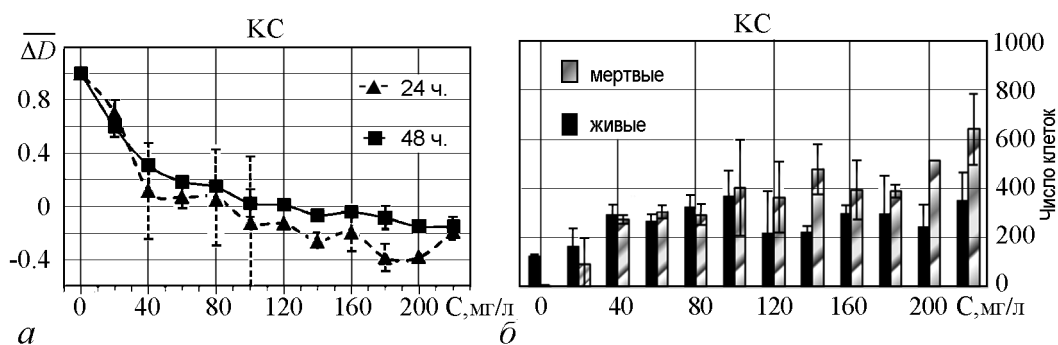


Рис. 8. Изменение относительной оптической плотности $\overline{\Delta D}$ суспензии *D. salina* в концентрационном ряду КС (а) и количество клеток в поле зрения флуоресцентного микроскопа в фокальной плоскости дна лунки, светящихся голубым (мертвые) и красным (живые) цветом после 24-часовой экспозиции (б). C – концентрация токсиканта [Ag], $D_0 = 0.08$, $D_{24}(0) = 0.22$, $D_{48}(0) = 0.45$

флуктуации $\overline{\Delta D}(C)$ в области нулевых значений.

Подобного же рода флуктуации обращают на себя внимание и в случае КС (рис. 8). Можно отметить также, что данные фотометрии дают несколько завышенную оценку токсичности по сравнению с микроскопией.

Так, $\overline{\Delta D}_{24}(C > 100 \text{ мг/л}) < 0$ и $\overline{\Delta D}_{48}(C > 140 \text{ мг/л}) < 0$, в то время как флуоресцентная микроскопия показывает незначительные изменения в количестве живых и мертвых клеток во всем диапазоне 40...200 мг/л Ag. Вероятно, это связано с неконтролируемым вкладом агрегации серебряных наночастиц в поглощение.

Полученные в наших экспериментах данные по токсичности наносеребра в целом неплохо согласуются с опубликованными совсем недавно результатами исследователей из Египта и Саудовской Аравии [8], показавших LC50 КС в области концентраций примерно 50 мг/л для *Chlorella vulgaris* и *D. tertiolecta*.

Значительно более сложный случай представляют собой суспензии агрегационно неустойчивых золотых цитратных наночастиц, поскольку эволюция их спектров в красной области носит немонотонный характер при агрегации¹⁰. Однако визуальная оценка результатов двумерного эксперимента с 15 нм коллоидным золотом (КЗ-15) и ЦТАБ свидетельствовала о примерно равном токсическом действии ЦТАБ при изменении концентрации КЗ-15 от 0 до 50 мг/л Au. Смысл двумерного эксперимента заключается в том, что в серии параллельных рядов концентрация одного поллютанта изменяется в одном направлении, а другого в ортогональном. Во всех рядах в независимости от концентрации КЗ-15 зеленый оттенок сохранялся, начиная с колонки, где концентрация ЦТАБ была меньше 1 мг/л. Однако принятый для бесцветных поллютантов и препаратов серебра алгоритм расчета фотометрических характеристик не давал адекватной оценки из-за неконтролируемых хроматических изменений, связанных с агрегацией КЗ-15. Учитывая, что характерное время агрегации КЗ-15 – несколько часов, и приняв $\overline{\Delta D} = D_{48} - D_{24}$, мы получили такое же хорошее согласие данных фотометрии и микроскопии, как и в предыдущих экспериментах. Более того, нам удалось показать, что в смесях КЗ-15 ЦТАБ токсическое действие на *D. salina* определяется исключительно содержанием этого ПАВ.

¹⁰ Изначально красный цвет КЗ-15 при агрегации приобретает сначала голубой оттенок, затем становится нейтрально серым.

Выводы

Таким образом, можно констатировать следующие результаты по созданию простой системы оперативной оценки общей токсичности для одноклеточных растительных организмов плазмонно-резонансных наноматериалов, предназначенных для медико-биологического применения.

1. Диагностическая тест-система определения токсичности наноматериалов, основанная на измерении фотодеструкции хлорофилла поврежденных клеток соленоводной микроводоросли *D. salina* фотометрическим и микроскопическим способом, позволяет оперативно находить основные токсикометрические характеристики поллютантов – LOEC, LC50, LC100.

2. Минимальная действующая концентрация токсиканта определяется как достоверное увеличение числа мертвых клеток – светящихся синим цветом при соответствующем освещении в поле зрения флуоресцентного микроскопа.

3. Медианная величина токсического действия определяется по графику зависимости изменения оптической плотности в области красного максимума поглощения хлорофилла от концентрации токсиканта как точки пересечения экстраполяционной кривой линии нулевого значения функции. Эти точки соответствуют примерно равенству живых и мертвых клеток, выявляемых флуоресцентным микроскопическим способом.

4. Исследование различных форм препаратов серебра показало, что токсическое действие на микроводоросль *D. salina* уменьшается в ряду «нитрат серебра \geq протеинат серебра \gg металлическое коллоидное серебро».

5. В согласии с литературными данными, полученными на культурах клеток животных, показано, что токсичность ЦТАБ-содержащих препаратов золотых наночастиц определяется, главным образом, содержанием свободного ПАВ, а не самими частицами.

Следующие шаги в разработке данной темы будут состоять: в определении границы применимости диагностической тест-системы; выяснении влияния на реакцию клеточной системы возраста культуры, гетерогенности популяции микроводорослей, изменения условий среды. Следует изучить процессы, происходящие внутри клетки, защищающейся от токсического воздействия.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 12-04-00629-а и 14-04-00114-а, гранта РНФ 14-13-01167. В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Библиографический список

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 319 с.
2. Khlebtsov N., Bogatyrev V., Dykman L., Khlebtsov B., Staroverov S., Shirokov A., Matora L., Khanadeev V., Pylaev T., Tsyganova N., Terentyuk G. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites // *Theranostics*. 2013. № 3(3). P. 167.

3. URL: http://enc-dic.com/enc_biology/Porjadok-poliblefaridoverolybpharidales-1023.html
4. *Богатырев В.А.* Коллоидное золото в световой микроскопии // Известия вузов. Прикладная нелинейная динамика. 2012. Т. 20, № 1. С. 43.
5. *Масюк Н.П., Посудин Ю.И., Лилицкая Г.Г.* Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (Dunaliellales, Chlorophyceae, Viridiplantae). Киев, 2007. 264 с.
6. *Mecozzi M., Onorati F., Oteri F., Sarni A.* Characterisation of a bioassay using the marine alga *Dunaliella tertiolecta* associated with spectroscopic (visible and infrared) detection // Int. J. Environment and Pollution. 2008. Vol. 32. P. 104.
7. URL: <http://imagej.ru/>
8. *Hazani A.A., Ibrahim M.M., Shehata A.I., El-Gaaly G.A., Daoud M., Fouad D., Rizwana H., Moubayed N.M.S.* Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* // Arch. Biol. Sci. 2013. № 65. P. 1447.

Поступила в редакцию 15.12.2014

LABORATORY DIAGNOSTIC SYSTEM OF TOXICITY OF NANOMATERIALS

V. A. Bogatyrev

The Russian Academy of Sciences' Institute of Biochemistry
and Physiology of Plants and Microorganisms

The paper describes the results of experimental work of students and post-graduate students of the Department of Biophysics of the FNP SSU and the laboratory of nanobiotechnology IBPPM RAS to identify the potential danger of plasmon-resonance nanomaterials in biomedical research, namely the development of software and instrument complex spectrophotometric and microscopic measurements to estimate viability of microalgae *Dunaliella salina* and determine the toxicity of the components of incubation medium.

Keywords: Nanotoxicology, nanoparticles, spectrophotometry, fluorescence microscopy.



Богатырев Владимир Александрович – родился (1958) в Мончегорске Мурманской обл., окончил Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского (1980). После окончания СГУ работает в ИБФРМ РАН ведущим научным сотрудником. Защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук в РосНИПЧИ «Микроб» (1995) по специальности микробиология и доктора биологических наук в ИБФРМ РАН (2005) по специальности биохимия. Работает в области биохимии, биофизики, нанобиотехнологии. Автор монографий «Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение» (в соавторстве с Дыкманом Л.А., Щеголевым С.Ю. и Хлебцовым Н.Г.), «Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant» (соавторстве с Дыкманом Л.А., Староверовым С.А. и Щеголевым С.Ю.). Общее число публикаций 135 по направлениям, указанным выше. Индекс Хирша по версии РИНЦ – 19.

410049 Саратов, пр-т Энтузиастов, д. 13
Институт биологии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
E-mail: vabog58@gmail.com