

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Онищенко Г.Г.<sup>1</sup>, Арчаков А.И.<sup>2</sup>, Бессонов В.В.<sup>3</sup>, Божитко Б.Г.<sup>1</sup>,  
Гинцбург А.Л.<sup>4</sup>, Гмошинский И.В.<sup>3</sup>, Григорьев А.И.<sup>5</sup>, Измеров Н.Ф.<sup>6</sup>,  
Кирпичников М.Л.<sup>7</sup>, Народицкий Б.С.<sup>4</sup>, Покровский В.И.<sup>8</sup>, Потапов А.И.<sup>9</sup>,  
Рахманин Ю.А.<sup>10</sup>, Тутельян В.А.<sup>3</sup>, Хотимченко С.А.<sup>3</sup>, Шайтан К.В.<sup>7</sup>,  
Шевелева С.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека,

<sup>2</sup> ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,

<sup>3</sup> ГУ НИИ питания РАМН,

<sup>4</sup> ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика  
Н.Ф. Гамалеи РАМН,

<sup>5</sup> Государственный научный центр РФ - Институт медико-биологических  
проблем РАН,

<sup>6</sup> ГУ НИИ медицины труда РАМН,

<sup>7</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова,

<sup>8</sup> ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,

<sup>9</sup> ФГУН Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана  
Роспотребнадзора,

<sup>10</sup> ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина  
РАМН

В настоящее время во всем мире всё возрастающее внимание уделяется перспективам развития нанотехнологий, то есть технологий направленного получения и применения веществ и материалов в диапазоне размеров до 100 нм. Материалы, полученные с использованием нанотехнологий, могут найти и уже находят применение в микроэлектронике, энергетике, химической промышленности, оптике, строительстве, химической промышленности, научных исследованиях, контроле и охране состояния окружающей среды [1-3,8,9,11,16,17]. Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая

активность могут быть использованы также для адресной доставки лекарственных препаратов и -вакцин, для борьбы с кардиологическими, онкологическим и другими заболеваниями, а также инфекциями [3,8,10,12,13,16], для целей генной и молекулярной инженерии, улучшения качества окружающей среды, в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности и многих иных областях [17]. Объемы производства и рынок наноматериалов во всем мире в настоящее время стремительно развиваются. По прогнозу общий объем продаж продукции, полученной с использованием нанотехнологий, превысит к 2015 г. 10 триллионов долларов США [11]. Производство только одного вида наноматериалов, такого как углеродные нанотрубки, составлявшее в 2003 г. во всем мире только 3 тонны, может достичь в 2008 г. 120 т (т.е. возрастёт в 40 раз за 5 лет). Быстро развивается производство некоторых видов наноматериалов и в Российской Федерации [1]. В ходе полного цикла их оборота, включающего производство, применение и утилизацию наноматериалы, даже не предназначенные непосредственно для использования в медицине, питании и быту, будут с неизбежностью поступать в среду обитания и попадать в организм человека. Вследствие всего этого степень экспозиции человека различными наноматериалами в ближайшее время будет неизбежно увеличиваться [11,21,22,27].

Поскольку вещество в виде наночастиц и наноматериалов обладает свойствами, часто радикально отличными от их аналогов в форме макроскопических дисперсий или сплошных фаз, наноматериалы представляют собой принципиально новый фактор, воздействующий на организм и среду его обитания. Это ставит на повестку дня разработку методов оценки риска возможного негативного воздействия наноматериалов на здоровье человека и организацию контроля за их оборотом [11,21,22]. За рубежом проблема безопасности наноматериалов в настоящее время широко исследуется в США (Food and Drug Administration), Евросоюзе, а также в ряде международных организаций (ВОЗ, ILSI) [25]. В России необходимость развёртывания работ по проблеме оценки безопасности наноматериалов обосновывается в

Постановлении Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 54 от 23.07.2007 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы» и информационном письме Роспотребнадзора «О надзоре за производством и оборотом продукции, содержащей наноматериалы» [4,5].

Производством нанотехнологий, рассматриваемой как система целенаправленного манипулирования веществом на наномасштабе размеров [11], являются различные материалы и препараты, содержащие наночастицы. Под наночастицами в настоящее время большинством авторов понимаются высокодисперсные частицы размером менее 100 нм хотя бы в одном измерении с заданной структурой и свойствами. Классификация наночастиц может быть построена, во-первых, на характеристике их формы. В этом случае различают точечные наночастицы (с размером менее 100 в любом измерении), линейные (протяженные) объекты, такие как нанотрубки углерода, нановолокна, нанонити, нанофиламенты, обладающие одним протяженным макроскопическим измерением (длинной), двумерные объекты (плёнки нанометровой толщины) и, наконец, трехмерные объекты с тонкой (фрактальной) структурой в нанометровом диапазоне (нанопены), нанокомпозиты и др. [11]. Второй тип классификации основан на химическом составе и включает наночастицы углерода (фуллерены, нанотрубки, графен), наночастицы элементарных (простых) веществ, бинарных соединений (окислов, сульфидов, нитридов и др.), сложных (тройных и более) химических соединений, наночастицы органических полимеров и биологических макромолекул [11]. Третий тип классификации основан на пути получения веществ в наноформе. Это, во-первых, «нисходящий» путь, то есть получение наночастиц путём сверхтонкого помола веществ в форме сплошных фаз или макродисперсий. Во-вторых, это «восходящий» путь, состоящий в молекулярной конденсации наночастиц из растворов или из газовой фазы, насыщенной парами веществ под воздействием электрического разряда, лазерного излучения, высокотемпературной плазмы [11] и др.

Разрабатывая пути и подходы к оценке безопасности наноматериалов, в первую очередь, необходимо рассмотреть особенности их физико-химических свойств и биологического действия, которые отличают их от аналогов того же химического состава в виде сплошных фаз макроскопических дисперсий. По данным литературы, можно выделить следующий ряд физико-химических особенностей поведения веществ в наноразмерном состоянии [11,21,27].

*Во-первых, увеличение химического потенциала* веществ на межфазной границе высокой кривизны. Большая кривизна поверхности наночастицы и изменение топологии связи атомов на поверхности приводит к изменению их химических потенциалов. Вследствие этого существенно изменяется растворимость, реакционная и каталитическая способность наночастиц и их компонентов.

*Во-вторых, большая удельная поверхность наноматериалов.* Очень высокая удельная поверхность (в расчете на единицу массы) наноматериалов увеличивает их адсорбционную емкость, химическую реакционную способность и каталитические свойства. Это может приводить, в частности, к увеличению продукции свободных радикалов и активных форм кислорода и далее к повреждению биологических структур (липиды, белки, нуклеиновые кислоты, в частности, ДНК).

*В-третьих, небольшие размеры и разнообразие форм наночастиц.* Наночастицы вследствие своих небольших размеров могут связываться с нуклеиновыми кислотами (вызывая, например, образование аддуктов ДНК), белкам, встраиваться в мембраны, проникать в клеточные органеллы и, тем самым, изменять функции биоструктур. При этом наночастицы могут не вызывать иммунный ответ и не элиминироваться защитными системами организма. Процессы переноса наночастиц в окружающей среде с воздушными и водными потоками, их накопление в почве, донных отложениях могут также значительно отличаться от поведения частиц веществ более крупного размера.

*В-четвертых, высокая адсорбционная активность.* Из-за своей высокоразвитой поверхности наночастицы обладают свойствами

высокоэффективных адсорбентов, то есть, способны поглощать на единицу своей массы во много раз больше адсорбируемых веществ, чем макроскопические дисперсии. Возможна, в частности, адсорбция на наночастицах различных контаминантов и облегчение их транспорта внутрь клетки, что резко увеличивает токсичность последних. Многие наноматериалы обладают гидрофобными свойствами или являются электрически заряженными, что усиливает как процессы адсорбции на них различных токсикантов, так и их способность проникать через барьеры организма.

*В-пятых, высокая способность к аккумуляции.* Возможно, что из-за малого размера наночастицы не распознаются защитными системами организма, не подвергаются биотрансформации и не выводятся из организма. Это ведет к накоплению наноматериалов в растительных, животных организмах, а также микроорганизмах, передаче по пищевой цепи, что, тем самым, увеличивает их поступление в организм человека.

Таким образом, все эти факторы свидетельствует о том, что наноматериалы могут обладать совершенно новыми физико-химическими свойствами и биологическим (в том числе токсическим) действием, чем вещества в обычном физико-химическом состоянии, и поэтому они должны во всех случаях быть отнесены к новым видам материалов и продукции, характеристика потенциального риска которых для здоровья человека и состояния среды обитания во всех случаях является обязательной.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что при оценке безопасности наноматериалов в первую очередь следует учитывать их воздействие на такие важнейшие биологические характеристики, как проницаемость биомембран, генотоксичность, активность окислительно-восстановительных процессов, включая перекисное окисление липидов, биотрансформация и элиминация из организма.

С другой стороны, существующая в настоящее время методология оценки риска основывается на полной токсикологической оценке каждого конкретного вещества, определении зависимости «доза-эффект», данных о содержании

вещества в объектах окружающей среды и пищевых продуктах, расчете нагрузки на население, что позволяет рассчитать возможные имеющиеся риски [6,7]. Однако для наноматериалов в связи с особенностями их строения и поведения данная методология может быть применима ограниченно (или неприменима) в связи со следующими причинами [11,15,21,22,26]:

- *токсичность наночастиц* не может быть выведена по сравнению с аналогами в макродисперсной форме или в виде сплошных фаз, так как токсикологические свойства наноматериалов являются результатом не только их химического состава, но и разнообразия их других особенностей, таких как поверхностные характеристики, размер, форма, состав, химическая реактивность и др.;

- *имеющиеся токсикологические методологии* основаны на определении токсичности вещества относительно массовой концентрации, что не приемлемо для наноматериалов, для которых основными определяющими свойствами могут быть величина площади поверхности или число наночастиц;

- *отсутствуют стандартизованные индикаторы* нанотоксичности, которые должны обязательно учитывать вклад таких характеристик, как поверхностные свойства, размер, форма, состав, химическая реактивность составляющих их частиц;

- *отсутствуют надёжные данные об органах-мишенях* действия конкретных наноматериалов;

- *методы выявления, идентификации* и количественного определения наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биосредах, которые могли бы достоверно отличить их от химических аналогов в макродисперсной форме, недостаточно разработаны;

- *отсутствуют или недоступны новые базы данных* и математические модели, опирающиеся на достижения биоинформатики и на экспериментальные данные по токсичности отдельных наноматериалов.

несмотря на то, что наноматериалы используются достаточно длительное время, ни один вид не был изучен в полном объеме безопасност Фактически,

безопасности наноматериалов не позволяют точно оценить их потенциальные риски.

Одним из основных вопросов является наличие **высокочувствительных методов обнаружения, идентификации и количественного определения** наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и биологических средах. При этом должны использоваться методы оценки, обладающие специфичностью, позволяющей, что очень важно, отличить наноматериалы от их химических аналогов в виде сплошных фаз или макроскопических дисперсий. Перечень используемых методов представлен в табл.

Методы, применяемые для характеристики физико-химических свойств наноматериалов

Показатель	Рескомндуемый метод определения
Химический состав частиц	Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой Атомно-абсорбционная спектрофотометрия Инверсионная вольтамперометрия
Фазовый состав частиц	Масс-спектрометрия высокого разрешения с лазерной ионизацией и десорбцией на матрице (MALDI) Рентгеноэмиссионная спектрометрия. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (ESCA) Гамма-резонансная Мессбауэровская спектрометрия Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
Распределение частиц по размерам Форма наночастиц	Лазерная корреляционная спектрометрия Сканирующая туннельная микроскопия Атомно-силовая микроскопия Просвечивающая и сканирующая растровая электронная микроскопия
Определение удельной поверхности Оценка взаимодействия с биологическими макромолекулами (нуклеиновыми кислотами, белками, липидами и биологическим мембранами), возможность проникновения через биологические барьеры	Метод ВЕТ (изотермы адсорбции инертных газов) и гелисаа пикнометрия Атомно-силовая микроскопия Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия Светооптическая флуоресцентная микроскопия Светооптическая коллоидальная микроскопия Спектрометрия деполаризации флуоресценции Спектрометрия кругового дихроизма Спектрофлуориметрия ЯМР- и ЭПР-спектрометрия Масс-спектрометрия Метод радиоактивных индикаторов Аналитическое ультрацентрифугирование Жидкостная хроматография высокого разрешения

Химический состав наноматериалов может быть определен с использованием методов элементного анализа, традиционно применяемых в токсикологических исследованиях. Из них атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой является наиболее современным, универсальным и высоко чувствительным методом, позволяющим проводить определение большого числа химических элементов в образце. Недостатком метода является очень высокая сложность и стоимость применяемой аппаратуры, которая может быть доступна только наиболее крупным исследовательским центрам. В качестве рутинных методов анализа, обладающих достаточной чувствительностью для определения химического состава отдельных наноматериалов и их отдельных фракций, могут быть использованы атомно-абсорбционная спектрофотометрия и инверсионная вольтамперометрия.

Помимо общего химического состава при характеристике наноматериалов должен быть определен их фазовый состав, т.е. распределение компонентов (фаз) между различными участками и слоями наночастиц. Изучение такого распределения позволяет определить гетерогенность структуры входящих в тестируемый материал частиц, что особенно важно при изучении искусственно сконструированных наночастиц. Из числа подходов, обладающих наиболее высокой чувствительностью и разрешающей способностью, для решения поставленной задачи следует указать на методы масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией на матрице (MALDI), рентгеноэмиссионной спектрометрии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (ESCA). Если первый из этих методов наиболее универсален и применим к характеристике фазового состава практически любых частиц, то последние два метода наиболее эффективны при анализе состава фаз, содержащих атомы тяжелых элементов. Помимо этого гамма-резонансная Мессбауэровская спектроскопия может использоваться при определении химического окружения некоторых атомов, имеющих ядерные полосы поглощения для гамма-лучей, например, атомов железа. Спектроскопия

ядерного магнитного резонанса (ЯМР) может быть использована для изучения формы химической связи атомов водорода, изотопа  $^{13}\text{C}$  и некоторых других элементов, входящих в состав наночастиц. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) позволяет оценить наличие в составе тестируемых наноматериалов парамагнитных частиц с неспаренными электронами (свободных радикалов) и проанализировать особенности их химического окружения. Все перечисленные методы для своей реализации требуют сложного аппаратного оформления.

Следующей важной характеристикой является распределение частиц по размерам. Оно может быть проанализировано с использованием метода лазерной корреляционной спектроскопии. Принцип метода основан на использовании эффекта нелинейного (комбинационного) рассеивания лазерного излучения на ультравысокодисперсных частицах, распределенных в объеме оптически прозрачной среды (воды или органического растворителя). С помощью данного метода можно с высокой специфичностью подтвердить, что тестируемый материал содержит частицы, находящиеся в диапазоне линейных размеров наночастицы 1-100 нм, т.е. наночастицы.

Методами оценки формы наночастиц являются электронная микроскопия (как просвечивающая, так и сканирующая), сканирующая туннельная и атомно-силовая микроскопия. Электронно-микроскопическое исследование позволяет непосредственно наблюдать частицы определенной формы, находящиеся в составе образцов (на ультратонких срезах) или адсорбированные на различных поверхностях. Недостатком метода является сложность его аппаратного оформления и, отчасти, недостаточная разрешающая способность. Электронная микроскопия трудно применима к объектам, содержащим легкие атомы (биологические объекты), без их дополнительного контрастирования тяжелыми элементами (как правило, соединениями осмия), что может повлиять на структуру анализируемых препаратов и явиться потенциальным источником артефактов.

В отличие от этого сканирующая туннельная микроскопия (СТМ) позволяет исследовать структуру наночастиц, нанесенных на поверхности различных типов, непосредственно с разрешающей способностью менее 1 нм, т.е. близко к диапазону молекулярных и атомных размеров. Принцип СТМ состоит в сканировании поверхности образца токопроводящим острием, на которое подан электрический потенциал. Возникающий при этом туннельный ток электронов фиксируется чувствительной электронной схемой. Величина туннельного тока зависит от расстояния от острия до образца, то есть фактически от его рельефа в нанодиапазоне размеров. Аппаратурное оформление СТМ является достаточно простым и компактным, что делает этот метод потенциально очень широко применимым. Его ограничения связаны, главным образом, с необходимостью сканирования именно металлических или полупроводниковых поверхностей, обладающих электронной и (или) дырочной проводимостью. Применение же СТМ для сканирования диэлектрических поверхностей встречает значительные методические трудности.

Этого недостатка лишен метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), при котором в ходе сканирования поверхности острием регистрируется не ток, а сила притяжения острия к неровностям поверхности, определяемая межмолекулярными взаимодействиями Ван-дер-Ваальса. АСМ применима при характеристике любых видов наноматериалов, в том числе диэлектриков, однако её разрешающая способность по сравнению с СТМ существенно меньше. В настоящее время предпринимаются попытки создать универсальные приборы, способные работать как на принципе СТМ, так и АСМ.

Критически важной характеристикой наноматериалов, отличающей их от веществ традиционной дисперсности, является наличие очень высокой удельной межфазной поверхности. При её количественной оценке могут применяться методы гелиевой пикнометрии и ВЕТ. Последний подход состоит в построении изотермы адсорбции некоторых инертных газов (гелий, неон) на высокоразвитой поверхности частиц в составе тестируемых наноматериалов.

Чувствительность и специфичность рассматриваемых методов адекватна задаче изучения поверхностных свойств вещества в виде наночастиц.

Заключительным этапом физико-химической характеристики наноматериалов, непосредственно предшествующим их биологическому тестированию, является оценка их взаимодействия с биологическими макромолекулами (нуклеиновые кислоты, белки, липиды и биологические мембраны) и возможности проникновения через биологические барьеры. Непосредственно связывание наночастиц с биологическими макромолекулами, адсорбированными на различных поверхностях, можно наблюдать с помощью вышеуказанных методов электронной микроскопии, СТМ и АСМ. Следует, однако, учитывать модельный характер таких исследований и с осторожностью экстраполировать получаемые результаты на случай взаимодействия наночастиц с биологическими объектами.

Косвенные, но более надежные подходы связаны с регистрацией изменений в структуре биологических макромолекул, происходящих под воздействием наночастиц. Взаимодействуя с белками, они могут изменять их конформацию (третичную структуру), что может быть зарегистрировано с использованием методов дисперсии оптического вращения, спектроскопии кругового дихроизма, дифференциальной сканирующей калориметрии, спектрофлуориметрии. При встраивании наночастиц в биомембраны может претерпевать изменение показатель подвижности липидного бислоя, что может быть зафиксировано с использованием эффекта деполяризации флуоресценции встраиваемых в мембраны флуоресцентных зондов. Наконец, с использованием методов аналитического центрифугирования, радиоактивных индикаторов, высокоэффективной жидкостной хроматографии можно определять взаимодействие наночастиц с широким кругом биологических молекул и структур, в том числе с нуклеиновыми кислотами, нуклеопротеинами, мембранами. Изменение состава и структуры наночастиц в результате взаимодействия с биологическими объектами, в свою очередь, может быть

охарактеризовано с помощью масс-спектрометрии, ЯМР- и ЭПР-спектроскопии.

Таким образом, использование части вышеперечисленных методов позволяет изучить закономерности взаимодействия наночастиц с биологическими объектами в диапазоне от молекулы до клетки и те изменения свойств наноматериалов, которыми это взаимодействие может сопровождаться. Другая группа методов позволяет охарактеризовать нарушения в структуре собственно биологических макромолекул, надмолекулярных комплексов, мембран и клеточных органелл, которые могут возникать под влиянием наноматериалов. Результаты, получаемые с помощью вышеуказанных подходов, являются взаимно дополняющими, и перечисленные методы следует использовать в комплексе при анализе потенциальных опасностей, связанных с биологическими эффектами наноматериалов.

Вторым определяющим моментом в оценке риска является установление **возможной токсичности наноматериалов**. Имеющееся в настоящее время незначительное количество исследований в этом направлении указывает на то, что наноматериалы могут быть токсичными, тогда как их эквивалент в обычной форме в этой же концентрации безопасен. Показано, что даже однократная ингаляция углеродных нанотрубок [24] и наночастиц некоторых других типов [14,20,28] вызывает у экспериментальных животных воспалительный процесс в легочной ткани с последующим некрозом клеток и развитием фиброза, что, возможно, способно привести к канцерогенезу. Наноматериалы обладают нейротоксичностью, том числе, по-видимому, за счет прохождения через гематоэнцефалический барьер [23], вызывая окислительный стресс в клетках мозга; кардиотоксичность и гепатотоксичность наноматериалов также определяется развитием окислительного стресса и воспалительной реакции [29], что приводит к апоптозу и некрозу клеток; имеются отдельные сведения, что наночастицы могут неблагоприятно влиять на систему свертывания крови [18]. В отношении генотоксичности, тератогенности, эмбриотоксичности,

мутагенности, канцерогенности, аллергенности, влияния на гормональный и иммунный статус, достоверные данные в литературе отсутствуют.

С другой стороны, в литературе рассматривается возможность применения наноматериалов в качестве селективных переносчиков лекарств к органам и тканям и использование некоторых нутриентов (главным образом жирорастворимых витаминов, макро- и микроэлементов, биологически активных веществ) в виде наночастиц или в комплексе с инертными наноматериалами - носителями с целью обогащения пищевых продуктов для профилактики алиментарно зависимых состояний у населения [11,17]. Однако эффективность использования в питании человека продуктов, содержащих наночастицы пищевых веществ, в настоящее время практически не изучена, а метаболизм наноматериалов - носителей неизвестен, что, с одной стороны, обуславливает необходимость оценки биодоступности и усвояемости таких компонентов, а, с другой - оценки их безопасности.

Таким образом, фактически в настоящее время токсичность различных наноматериалов изучена крайне недостаточно, в том числе нет данных по метаболизму и механизму их действия, не определены критические органы и системы. Обобщая имеющиеся литературные данные, следует обратить внимание на два факта. Во-первых, в большинстве проведенных исследований указывается на то, что определяющим в токсичности наноматериалов является развитие окислительного стресса и повреждения ДНК, что может приводить к воспалительной реакции, апоптозу и некрозу клетки. При этом, возможно, что на первый план выходит не количество поступивших наноматериалов, а площадь их поверхности, которая и будет определять их реакционную способность. Кроме того, нельзя исключать и наличия других механизмов, связанных, в частности, с повреждающим действием наноматериалов на клеточные мембраны и органеллы, усилением транспорта потенциально токсичных компонентов через барьеры организма, а также возможной генотоксичностью и аллергизирующим действием.

Во-вторых, принципиально важной характеристикой, которую следует учитывать при оценке возможного токсического действия наноматериалов, является их нерастворимость в воде и биологических средах. Действительно, как только наночастицы растворяются, все эффекты, связанные с наличием у них высокоразвитой поверхности и с различными гетерофазно протекающими процессами утрачиваются, и по своему токсическому действию водорастворимый наноматериал ничем не будет отличаться от его аналога в макро-дисперсной форме. Поэтому уже на первом этапе оценки безопасности наноматериалов одной из важнейших характеристик является нерастворимость в водных средах при физиологических значениях pH, ионной силы и температуры.

Еще одной важной характеристикой наночастиц является показатель их формы - «аспектное отношение», т.е. отношение длины частиц к их минимальному линейному размеру [21]. По аналогии с такими объектами в макродисперсной форме, как волокна асбеста, можно предположить, что линейно протяженные наноструктуры, такие как углеродные нанотрубки, могут обладать большей потенциальной токсичностью, чем аналогичные по составу частицы, обладающие менее выраженной эксцентричностью формы.

Следующим важнейшим этапом является оценка поступления, распределения и выведения наноматериалов из организма. В настоящее время считается, что существует три основных пути поступления наноматериалов в организм человека: ингаляционный, через кожу и перорально [19,20,23,24]. Вопрос о возможных путях поступления наночастиц различной природы в организм, их прохождения через биологические барьеры, распределения и накопления в различных органах и тканях в настоящее время интенсивно исследуется [11,21,22]. В результате экспозиции наночастицами, содержащимися в воздухе, воде, а также входящими в состав материалов одежды, парфюмерно-косметических средств, препаратов бытовой химии возможно их проникновение в организм через неповрежденную кожу.

В литературе рассматривается несколько путей такого поступления, включая трансэпидермальный перенос и проникновение по волосяным фолликулам. Проникающие через кожу наночастицы могут обнаруживаться в лимфе, поступать в системную циркуляцию и в дальнейшем накапливаться во внутренних органах, включая лёгкие, почки, селезенку, сердце, головной мозг. Во многом аналогичное распределение отмечается при ингаляционном пути экспозиции наночастицами. При этом возможна их абсорбция в альвеолах с дальнейшим проникновением в кровотоки. Имеются данные, что при ингаляции наночастиц они могут проникать в головной мозг непосредственно путём распространения по ходу обонятельного нерва, минуя системную циркуляцию [23]. Что же касается поступления наночастиц в мозг из крови, то критически важным представляется их способность проникать через гематоэнцефалический барьер, которая в настоящее время интенсивно исследуется [23].

Желудочно-кишечный тракт является входными воротами для наночастиц, в первую очередь, при их приёме в составе пищи, и лекарственных средств. Местом абсорбции наночастиц является тонкая кишка. Электронно-микроскопическими методами показано, что наночастицы способны преодолевать эпителиальный барьер слизистой оболочки кишки по механизму эндоцитоза, поступая при этом в лимфу. Возможно, что какое-то количество частиц может всасываться из просвета кишки и непосредственно в кровь воротной вены и далее накапливаться печени [11].

Выведение наночастиц из организма, по современным представлениям, возможно с калом, мочой, грудным молоком, выдыхаемым воздухом и потом. Относительная роль всех этих путей в общем процессе клиренса наночастиц исследована пока недостаточно [11,21-23].

Таким образом, оценка безопасности наноматериалов должна включать следующие основные блоки:

- методы обнаружения, идентификации и количественного определения наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и

биологических средах, позволяющие отличить наноматериалы от их аналогов в традиционной, т.е. макродисперсной форме;

- изучение взаимодействия наноматериалов с липидами, белками, нуклеиновыми кислотами (ДНК, РНК, клеточные мембраны, рибосомы, ферменты, цитохромы P-450) в системах *in vitro*;

- изучение механизмов проникновения наноматериалов через биомембраны, связывания с мембранными рецепторами в системе *in vitro*;

- изучение изменения характеристик наночастиц в составе модельных систем, воспроизводящих различные среды организма (желудочное и кишечное содержимое, кровь, лимфа, желчь, моча и т.д.);

- определение параметров острой, подострой и хронической токсичности, органотоксичности (нейротоксичность, гепатотоксичность, кардиотоксичность, иммунотоксичность, нефротоксичность и др.) и отдаленных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, канцерогенность), а также распределения наноматериалов по органам и тканям;

- определение параметров I и II фазы метаболизма ксенобиотиков и системы антиоксидантной защиты;

- изучение влияния наноматериалов на экспрессию генов, генотоксичность, апоптоз, протеомный и метаболомный профили, потенциальную аллергенность;

- изучение в моделях *in vitro* выживаемости пробиотических микроорганизмов нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта в присутствии наноматериалов, процессов всасывания наноматериалов в желудочно-кишечном тракте на моделях *in situ* и *in vivo* и определение влияния наноматериалов на микробиоценоз желудочно-кишечного тракта.

Итак, полная система оценки риска наноматериалов включает обширный комплекс физико-химических, биохимических, молекулярно-биологических, токсикологических тестов и специальных исследований, позволяющих провести всестороннюю оценку их воздействия на биологические объекты. Возникает вопрос, во всех ли случаях имеется необходимость в проведении

такого широкомасштабного исследования? Эта проблема особенно актуальна в свете того, что номенклатура создаваемых новых наноматериалов и продуктов нанотехнологий в обозримом будущем будет продолжать быстро расширяться. Согласно методологии оценки риска можно сформулировать условия, в соответствии с которыми тот или новый материал может быть отнесён к группе продукции с низкой, средней или высокой потенциальной опасностью (низкий, средний или высокий приоритет в исследованиях). В случае отнесения наноматериала к группе объектов с низкой потенциальной опасностью, он оценивается по имеющимся показателям для составляющих его компонентов в традиционной форме (макродисперсная или в виде сплошных фаз), а исследований по специфическому биологическому действию компонентов в виде наночастиц не требуется. Средний уровень потенциальной опасности означает, что необходима общетоксикологическая оценка материала и, при необходимости, проведение некоторых видов специальных исследований. Наконец, при высоком уровне потенциальной опасности проводится полный комплекс необходимых исследований.

Алгоритм оценки уровня потенциальной опасности основывается на фундаментальных характеристиках тестируемого материала и представляет собой следующее.

1) Производится ли наноматериал в объёме большем, чем 1 т в год, образуются ли аэрозоли в ходе производства; возможна ли прямая экспозиция материалом на персонал производства, потребителей продукции, населения?

Если нет (по всем пунктам) - это **низкий уровень потенциальной опасности.**

Если да (хотя бы по одному из пунктов), то переход к 2).

2) Растворим ли материал в воде?

Если нет - переход к 3).

Если да - это **низкий уровень потенциальной опасности.**

3) Является ли отношение максимального линейного размера частицы к минимальному (аспектное отношение) большим, чем 1:100?

Если нет - переход к 5).

Если да - переход к 4).

4) Превосходит ли максимальная размерность (длина) частиц 5 мкм?

Если нет - это **средний уровень потенциальной опасности.**

Если да - переход к 6).

5) Превосходит ли минимальная размерность (диаметр) частиц 100 нм?

Если нет - переход к 6).

Если да - это **средний уровень потенциальной опасности.**

6) Имеются ли данные о токсичности, биологических эффектах, способности вызывать окислительный стресс, генетические, эндокринные нарушения, аллергизацию у данного вида наноматериалов?

Если имеются данные об отсутствии всех указанных эффектов - переход к 7).

Если имеются данные о наличии хотя бы одного эффекта или данные по всем эффектам отсутствуют - это **высокий уровень потенциальной опасности.**

7) Имеются ли данные о возможности накопления наноматериала в среде обитания и организмах животных и растений или о возможности переноса на дальние расстояния и (или) передачи по пищевым цепям?

Если имеются данные об отсутствии эффекта - это **средний уровень потенциальной опасности.**

Если имеются данные о наличии эффекта или данные отсутствуют - это **высокий уровень потенциальной опасности.**

Именно такой интегральный подход позволяет ответить на все вопросы относительно безопасности того или иного вида наноматериалов. Вместе с тем, возможно, что доведение самих наноматериалов может различаться с их поведением в составе продукции (парфюмерно-косметическая продукция, лекарственные препараты, пищевые продукты, упаковочные материалы, средства защиты растений, дезинфектанты и др.) вследствие приобретения новых свойств. Поэтому при оценке безопасности продукции, содержащей

наноматериалы, следует сконцентрировать внимание на приоритетных органах-мишенях и ожидаемых биологических эффектах в зависимости от пути поступления. Так, кожа имеет приоритетное значение при использовании парфюмерно-косметической и хозяйственно-бытовой продукции; желудочно-кишечный тракт - в случае наличия наноматериалов в пище, лекарственных средствах; легкие подвергаются воздействию, в первую очередь, различными аэрозолями в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе; кровь - при парентеральном введении лекарственных средств. Во всех этих случаях необходимо учитывать специфические особенности поведения наноматериалов в зависимости от матрицы, а также вероятные пути их модификации и биотрансформации в организме.

Особого внимания требует разработка системы мероприятий по обеспечению безопасности используемых нанотехнологий и снижению неблагоприятных влияний наноматериалов на здоровье работников, непосредственно занятых в их производстве, или контактирующих с ними в процессе производства другой продукции.

#### Литература.

1. Алфимов М.В., Разумов В.Ф. Доклад рабочей группы «Индустрия наносистем и наноматериалов». - // Российские нанотехнологии.-2007.-Т.2, № 1-2.-С. 12-25
2. Арчаков А.И., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О. и др.. Атомно-силовая микроскопия для медицинской диагностики// Физикохимия ультрадисперсных(нано-) систем. Материалы VII Всероссийской конференции.- Москва.-2005.- С. 233.
3. Арчаков А.И. Оптико-биосенсорные биочипы для диагностики гепатитов В и С// Физикохимия ультрадисперсных (нано-) систем// Материалы VII Всероссийской конференции.- Москва.- 2005.- С 270.
4. «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы». Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 54 от 23.07.2007 г.

5. «О надзоре за производством и оборотом продукции, содержащей наноматериалы». Информационное письмо Роспотребнадзора № 0100/4502-07-02 от 02.05.2007 г.
6. Основы оценки риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. / Онищенко Г.Г., Новиков СМ., Рахманин Ю.А. и др. - М.: НИИ ЭЧ и ГОС, 2002. - 408 С.
7. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Р 2.1.10.1920-04. / Рахманин Ю.А., Новиков СМ., Шашина Т.А. и др. - М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 142 С.
8. Четчин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. Биочипы для медицинской диагностики// Российские нанотехнологий.-2006.-Т.1, № 1.-С.13-27
9. Borm P.J., Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery// J Nanosci. Nanotechnol.- 2004.- V.4, No 4.- P.521-531.
10. Borm P.J.A., Robbins D., Haubold S., et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC// Particle and Fibre Toxicology.- 2006.- V.3, No. 11.-P. 1-35
11. Cherukuri P., Gannon C.J., Leeuw T.K., et al. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence// PNAS.- 2006.-V.103, No. 50.-P. 18882-18886.
12. Ebbesen M, Jensen T.G. Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications// Journal of Biomedicine and Biotechnology .- 2006 .-No1.- Article ID51516.-P.1-11
13. Gurgueira S.A., Lawrence J., Coull B.//: Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation// Environ Health Perspect- 2002.-V. 110, No 7.-P.749-755.
14. Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery// J.Anat- 1996.-V.189, No 8.- P. 503-505

15. Maynard A.D. Nanotechnology: The Next Big Thing, or Much Ado about Nothing?// Ann. Occup. Hyg.- 2007.-V. 51, No. 1.- P. 1-12.
16. Nemmar A., Hoylaerts M.F., Hoet P.H., et al. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model// Am J. Respir. Crit. Care. Med.-2002.-V.166,N 10.-P.998-1004.
17. Nemmar A., Vanbilloen H., Hoylaerts M.F., et al. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster.//Am. J. Respir. Crit. Care. Med.- 2001.-V. 164, N 12.-P. 1665-1668.
18. Nurkiewicz T.R., Porter D.W., Barger M., et al.: Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure// Environ. Health Perspect.- 2006.- V.114, No5.-P.412- 419.
19. Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy// Particle and Fibre Toxicology.- 2005.- V.2, No 1.- P.8-43
20. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.// Environ. Health Perspect-2005.-V.113, No 8.-P.823-839.
21. Oberdorster G., Sharp Z., Elder A.P., et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain.// Inhal.Toxicol.- 2004.-V. 16, No4.- P. 437-445.
22. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R., et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice// Am. J.Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.- 2005.-V 289, N 5.-P.L698-L708.
23. Warheit D.B., Reed K.L, Webb T.R: Pulmonary toxicity studies in rats with triethoxyoctylsilane (OTES)-coated, pigment grade titanium dioxide particles: bridging studies to predict inhalation hazard // Exp. Lung Res.- 2003.-V. 29, No6.-P. 593-606.
24. Zhou Y.M., Zhong C.Y., Kennedy I.M., et al. Oxidative stress and NF kappa B activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles// Toxicol. Appl. Pharmacol.- 2003.- V.190, No 2.-P.157-169.
25. Thomas K.,Aguar P.,Kawasaki H.,et al. Research strategies for safety evaluation of Nanomaterials. Part VIII. International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials.//Toxicol.Sci.-2006.-V.92, No 1.-P.23-32.
26. Thomas K.,Sayre P. Research strategies for safety evaluation of Nanomaterials. Part I. Evaluation of human health applications of exposure to nanoscale materials// Toxicol.Sci.-2005.-V.87. No 2.-P.316-321.
27. Holsapple M.P.,Farland W.H., Landry T.D., et al. Research strategies for safety evaluation of Nanomaterials. Part II.Toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs.// Toxicol.Sci.-2005.-V.88, No1.-P.12-17.
28. Balshaw D.M.,Philbert M.,Suk W.A. Research strategies for safety evaluation of Nanomaterials. Part III. Nanoscale technologies for assessing risk and improving public health.// Toxicol.Sci.-2005.-V.88, No2.-P.298-306
29. Tsuji J.S.,Maynard A.D.,Howard P.C., et al. . Research strategies for safety evaluation of Nanomaterials. Part IV. Risk assessment of nanoparticles// Toxicol.Sci.-2006.-V.89, No1 .-P.42-50

## КЛЮЧЕВЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАНОТОКСИКОЛОГИИ

Ильин Л.А., Соловьев В.Ю.

ФГУП ГНЦ - Институт биофизики, г. Москва

В научное сообщество в последнее десятилетие прочно вошли новые понятия с частицей *нано*-. В литературе существуют несколько вариантов определения этого понятия. Но главное - оно касается технологий, производящих продукцию размеры которой не более 100 нанометров ( $1 \text{ нм} = 10 \text{ \AA} = 10^{-9} \text{ м}$ ).

Планируемое бурное развитие нанотехнологий в нашей стране ставит своей целью выйти на мировой рынок нанопродуктов и изделий из них уже в ближайшие годы. Принята программа развития нанотехнологий в России, которая предполагает создание специализированных центров по нанотехнологиям и ускоренному внедрению нанотехнологических производств в практическую деятельность.