

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е.И. Шишацкая
подпись инициалы, фамилия
« _____ » июля 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Изучение биологической активности углеродных наночастиц в культуре

in vitro

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – магистерская программа «Реконструктивная биоинженерия»

Руководитель	_____	профессор, д-р. биол. наук	Е. И. Шишацкая
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		О.Р. Максимова
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	профессор, д-р. биол. наук	В. С. Бондарь
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Использование наночастиц в современном мире.....	7
1.1.1 Наночастицы в пищевой отрасли.....	8
1.1.2 Наночастицы в сельском хозяйстве	8
1.1.3 Наночастицы в косметологии	9
1.1.4 Наночастицы в медицине	9
1.2 Пути проникновения наночастиц в организм	10
1.2.1. Кожные покровы.....	10
1.2.2. Дыхательная система.....	11
1.2.3. Пищеварительная система.....	11
1.3 Биологическая активность наночастиц <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	12
1.3.1. Цитотоксичность.....	12
1.3.2. Генотоксичность	13
1.3.3. Терратогенность.....	14
1.3.4. Гормональные дизрапторы.....	16
1.3.5. Процессы воспаления	17
1.3.6. Влияние на ЦНС	17
1.4 Влияние наночастиц на функциональный статус организма	19
1.5 Основа токсичности наночастиц.....	20

1.6	Разработка защитных мер.....	22
2	Материалы и методы	24
2.1	Выделение и культивирование эритроцитов	24
2.2	Получение углеродных наночастиц.....	26
2.3	Определение жизнеспособности эритроцитов (МТТ-тест)	26
2.4	Определение сорбционной емкости эритроцитов <i>in vitro</i>	26
2.5	Определение содержания МДА в эритроцитах <i>in vitro</i>	27
2.6	Определение осмотической резистентности эритроцитов <i>in vitro</i>	27
2.7	Измерение размераи дзета-потенциала углеродных наночастиц.....	28
2.8	Морфологический анализ	28
2.9	Сканирующая электронная микроскопия	28
2.10	Статистическая обработка результатов	29
3	Результаты и обсуждения	30
3.1	Спонтанный гемолиз эритроцитов <i>in vitro</i> Error! Bookmark not defined.	
3.2	Осмотическая резистентность эритроцитов <i>in vitro</i> Error! Bookmark not defined.	
3.3	Сорбционная емкость эритроцитов <i>in vitro</i> Error! Bookmark not defined.	
3.4	Активность восстановления МТТ в формазан в эритроцитах <i>in vitro</i> Error! Bookmark not defined.	
3.5	Содержание МДА в эритроцитах <i>in vitro</i> Error! Bookmark not defined.	

3.6 Анализ морфологических фенотипов эритроцитов *in vitro* **Error!**
Bookmark not defined.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ **Error! Bookmark not defined.**

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ 31

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация выполнена по теме «Изучение биологической активности углеродных наночастиц в культуре *in vitro*» содержит 58 страниц текстового документа, 8 иллюстраций, 8 таблиц и 91 источник литературы.

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, НАНОАЛМАЗЫ, ФУЛЛЕРЕНЫ, ЭРИТРОЦИТЫ, МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ, МЕМБРАНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ.

Объект – эритроциты капиллярной крови: 10 условно здоровых некурящих доноров 25 лет, 10 условно здоровых курящих доноров 25 лет, 10 условно здоровых некурящих доноров 50 лет, 10 условно здоровых курящих доноров 50 лет.

Цель - оценке возрастных особенностей мембранотропных эффектов углеродных наночастиц в культуре эритроцитов *in vitro*.

Задачи

Определить влияние углеродных наночастиц на:

- 1) Изучить активность и обратимость процессов трансформации клеток
- 2) Изучить активность свободно-радикального окисления липидов
- 3) Определить жизнеспособность клеток
- 4) Оценить структурную целостность мембран
- 5) Оценить стабильность мембранного скелета

Углеродные наночастицы не влияли на жизнеспособность и сорбционную емкость эритроцитов. Однако оказывали влияние на

стабильность мембранного скелета эритроцитов и уровень продукции активных форм кислорода, что сопровождалось морфологическими трансформациями эритроцитов. Дозо-зависимые эффекты варьировали в зависимости от морфологии частиц, возраста доноров в группах некурящих и курящих доноров.

ВВЕДЕНИЕ

Нанотехнологии стали главным потоком технологических инноваций нынешнего века. Следовательно, более высокие темпы производства также создают риск потенциального высвобождения этих наноструктурированных материалов в окружающую среду и связанного с этим вредного воздействия на экологию [1]. Развитие новых практических приложений наночастиц в сферах, связанных со здоровьем человека, значительно опережает формирование фундаментальных представлений о биологической активности наночастиц: эффекторные мишени, динамика процессов депонирования и клиренса в органах и тканях, системные эффекты наночастиц изучены недостаточно. Это затрудняет прогнозирование отдаленных биологических эффектов наночастиц и их потенциальной опасности для биосферы [2].

Экспериментальные и эпидемиологические исследования свидетельствуют, что, попадая в организм человека и животных, наночастицы увеличивают риск развития различных заболеваний в результате деструктивных окислительных модификаций белков, липидов, ДНК, а также в результате индукции эпигеномных перестроек и формирования «патогенных» вариантов паттернов экспрессии генов. Потенциальная биологическая опасность наночастиц определяет актуальность изучения механизмов реализации их активности в системах *in vivo* и *in vitro* [3].

Основными путями воздействия наночастиц на организм человека являются проникновение через кожу, попадание внутрь через продукты питания и путем вдыхания из воздуха. Кроме того, наночастицы могут проникать в другие органы через дыхательную и кровеносную системы.

Одной из эффекторных мишеней наночастиц являются клеточные мембраны. Мембранотропные эффекты наночастиц обусловлены их взаимодействием с белками, липидными молекулами и углеводным гликокаликсом. Индуцированные наночастицами окислительные модификации мембранных белков и липидов могут приводить к

значительным структурно-функциональным перестройкам мембран: дезагрегации липидных рафтов, изменению активности мембранных каналов, рецепторов и ферментов, нарушениям в системах рецепторного и механо-зависимого сигналинга, изменениям морфологии клеток.

Мембранотропные эффекты зависят от состава, дозы, размеров и морфологии наночастиц. С другой стороны, реализация биологической активности наночастиц в значительной степени может определяться и исходным структурно-функциональным статусом мембран. [4].

Современные исследования, объясняющие механизм диффузии наночастиц в организм человека, поглощение их клетками и тканями, а также распределение и возможная опасность для здоровья, недостаточны и изучаются во всем мире [5].

В связи с этим в данной работе изучали биологическую активность наночастиц в культуре *in vitro*.

Цель данной работы заключалась в оценке возрастных особенностей мембранотропных эффектов углеродных наночастиц в культуре эритроцитов *in vitro*.

Задачи исследования:

Определить влияние углеродных наночастиц на:

- 1) Изучить активность и обратимость процессов трансформации клеток
- 2) Изучить активность свободно-радикального окисления липидов
- 3) Определить жизнеспособность клеток
- 4) Оценить структурную целостность мембран
- 5) Оценить стабильность мембранного скелета

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета.

1 Обзор литературы

1.1 Использование наночастиц в современном мире

Нанотехнология произвела революцию в мире путем внедрения уникального класса материалов и потребительских товаров во многих отраслях. Это привело к производству инновационных материалов и устройств [6].

В последнее десятилетие наблюдается значительный прогресс в использовании наночастиц: на рынке представлено около 1814 продуктов на основе наноматериалов [7]. Учитывая этот факт, многие страны вкладывают значительные финансовые инвестиции в развитие нанотехнологии, поскольку наноматериалы обладают огромным потенциалом для разработки продуктов широкого спектра промышленных и биомедицинских направлений [8, 9].

Ежегодно наночастицы производятся в огромном количестве:

- Фуллерены C₆₀ – 500 тонн/год
- Углеродные нанотрубки 100 тонн/год
- Наночастицы кремния и диоксида кремния 100 000 тонн/год
- Наночастицы оксида цинка – 20 тонн/год
- Наночастицы диоксида титана – 5000 тонн/год
- Наночастицы серебра 500 – тонн/год.

В настоящее время наночастицы применяются в таких областях, как биотехнология [10], биочувствительность и безопасность [11] диагностика и терапия [12, 13], микробиологическая безопасность пищевых продуктов [14] и управление сточными водами [15].

Кроме того, нанотехнологии демонстрируют безграничный и постоянно растущий список промышленных применений, охватывающих такие области, как сельское хозяйство, пищевые продукты и напитки, строительство, текстиль, энергетическая электроника, оптика и косметика. Научно-исследовательские институты по всему миру активно работают над

исследованием и разработкой новых захватывающих приложений в области нанотехнологий, а дальновидные промышленники и правительства щедро финансируют исследовательские проекты, осознавая важность и влияние этой будущей технологии [16].

1.1.1 Наночастицы в пищевой отрасли

Нанотехнологии уже много лет используются в пищевой промышленности. Наночастицы могут дать такие преимущества, как улучшение диспергируемости водонерастворимых добавок в пищевых продуктах без использования дополнительного жира или поверхностно-активных веществ. «Нано-текстурирование» пищевых продуктов нацелено на создание наноструктур и стабильных продуктов питания, а также эмульсий для улучшения консистенции, вкуса, аромата и текстурных свойств.

В пищевой промышленности синтетический аморфный диоксид кремния (E551) был применен в качестве добавки к пище. Он используется в течение многих лет для очистки пива и вин, а также как анти-слеживающееся средство для поддержания порошковых изделий [17].

К примеру, наночастицы TiO_2 , SiO_2 и MgO используются в пищевой промышленности для сохранения цвета или долговечности продуктов.

Кальций соли NPs являются предметом патентных заявок для использования по назначению в жевательных резинках. Кальциевые и магниевые соли, а также железо на основе наночастиц, также доступны в качестве пищевых добавок [18].

1.1.2 Наночастицы в сельском хозяйстве

Наноудобрения повышают урожайность и качество сельскохозяйственных культур с более высокой эффективностью использования питательных веществ при одновременном снижении себестоимости производства и, таким образом, способствуют повышению устойчивости сельского хозяйства [19].

Нанопестициды благодаря медленной деградации и контролируемому высвобождению активных веществ в присутствии подходящих наноматериалов могут обеспечить эффективную борьбу с вредителями в течение длительного времени. Они также повышают эффективность и продуктивность сельскохозяйственных культур за счет повышения урожайности и снижения затрат на вводимые ресурсы за счет сокращения отходов и затрат труда [20].

Кроме того, наночастицы в сельском хозяйстве используются для ремедиации почв [21].

1.1.3 Наночастицы в косметологии

Распространенное использование наноматериалов в косметике заключается в усилении доставки косметических ингредиентов в организм человека через кожу. Также наночастицы могут быть использованы для придания стабильности косметическим составам.

Наночастицы диоксида титана и оксида цинка используются преимущественно в солнцезащитных безрецептурных лекарственных средствах, поскольку эти наноматериалы являются эффективными блокаторами ультрафиолетового излучения [22]

1.1.4 Наночастицы в медицине

Одним из наиболее эффективных применений наночастиц является наномедицина, которая охватывает использование наночастиц в диагностических и терапевтических целях. Как правило, наночастицы используются в качестве средств доставки для визуализации и терапевтических агентов, например, небольших молекул, белков, пептидов и нуклеиновых кислот. Для создания таких наночастиц были использованы многочисленные материалы, в том числе липиды, металл, кремний и кремнезем, полимеры, белки и углерод [23]. На сегодняшний день существует большое количество препаратов на основе наноматериалов,

предназначенных для лечения различных заболеваний, таких как неврологические расстройства, сахарный диабет, рак, инфекционные заболевания и аллергия [24].

Наноносители могут обеспечивать устойчивое и контролируемое высвобождение лекарственных средств. Кроме того, наночастицы обладают способностью уменьшать клиренс и улучшать накопление лекарственных веществ в пораженной ткани, тем самым повышая терапевтическую эффективность и уменьшая побочные эффекты. [25]. Также, некоторые наночастицы обладают уникальными электрическими и оптическими свойствами, которые могут быть использованы в терапевтических целях [23]. Например, наночастицы металлов могут быть использованы для термической абляции пораженной ткани. А квантовые точки используются для визуализации и диагностики рака. Наночастицы золота можно использовать непосредственно в качестве адъюванта для лечения заболеваний [26,27]

1.2 Пути проникновения наночастиц в организм

1.2.1. Кожные покровы

Более широкое использование косметических средств на основе наноструктур увеличивало воздействие наночастиц на кожу и в конечном итоге проникновение в кровообращение, что вызывало серьезные проблемы безопасности и здоровья [6]. Наночастицы могут проникать через клетки кожи (трансклеточный путь) и через волосяные фолликулы (фолликулярный путь проникновения). Считается, что наночастицы диоксида титана, класс наиболее широко используемых наночастиц, косвенно повреждают кожу. Быстрое распределение, плохая элиминация и повышенное накопление ткани являются ключевыми факторами, ответственными за повышенную цитотоксичность. Широкое использование наночастиц, следовательно, создает серьезные негативные последствия для развития наряду с другими рисками для здоровья. Как только наночастицы попадают в кожу они могут

показать свои различные токсические последствия, такие как повреждение ДНК, ингибирование митохондриальной активности и инициирование апоптоза [28].

1.2.2. Дыхательная система

Вдыхание наночастиц приводит к их проникновению в легкие и взаимодействию с присутствующим там слоем эпителия. Механизм осаждения в дыхательных путях обусловлен инерционным воздействием, за которым следует гравитационное осаждение, а также Броуновская диффузия. Последнее явление характерно для малых наночастиц, поскольку они ведут себя как молекулы газа и способны проникать в более глубокие тракты [29]. Вдыхание наночастиц и их воздействие на легкие зависят от: количества наночастиц, количества и скорости осаждения в легких, структурных свойств наночастиц и эффективности механизмов клиренса. Считается, что вдыхание наночастиц отрицательно влияет на астматические симптомы, вызывая быструю воспалительную реакцию [30].

1.2.3. Пищеварительная система

Использование наночастиц в сельском хозяйстве и пищевой промышленности получило огромное внимание в последнее десятилетие. Наночастицы в пищевой промышленности используются для разработки продуктов с новыми вкусовыми и текстурными характеристиками, для повышения способности поглощения питательных веществ, для улучшения упаковки пищевых продуктов. Кроме того, в некоторых странах уже синтезируется и используется разнообразный класс продуктов, связанных с пищевыми продуктами, таких как пищевые ингредиенты, добавки, добавки [31]. Помимо этих полезных аспектов широкое использование наночастиц в пищевой промышленности вызвало серьезные опасения в отношении безопасности. Прием наночастиц внутрь является одним из основных путей воздействия на организм человека. Наночастицы, прямо или косвенно

используемые в пищевых продуктах и лекарствах, принимаются внутрь и всасываются через пищеварительную систему, откуда они попадают в кровеносную систему и с током крови перемещаются в органы [32].

1.3 Биологическая активность наночастиц *in vivo* и *in vitro*

1.3.1. Цитотоксичность

Наночастицы после попадания в клетки могут вызывать снижение скорости пролиферации, апоптоза или некроза клеток. Известно, что различные наночастицы, включая медь, золото, серебро, углеродные нанотрубки, фуллерены и другие, оказывают цитотоксическое действие *in vitro* и *in vivo*. Цитотоксичность наночастиц - это, как правило, следствие окислительного стресса. Помимо окислительного стресса, различные механизмы, такие как прямое повреждение клеточной мембраны, митохондриальная дисфункция, повреждение ДНК, лизосомальная дисфункция, высвобождение ионов металлов и нарушение цитоскелета актина, также ответственны за придание цитотоксического потенциала наночастицам. Наночастицы могут влиять на целостность мембраны либо путем прямого механического воздействия на мембранные компоненты, либо путем образования активных форм кислорода с последующим окислением мембранных липидов. Кроме того, наночастицы могут также взаимодействовать с поверхностными рецепторами, присутствующими на мембране [33]. Прямое повреждение митохондриальных мембран было показано с помощью кремнеземных наночастиц [34]. Кроме того, наночастицы оксида цинка может вызывать повреждение митохондрий токсическими концентрациями ионов Zn^{2+} [35]. Asare и соавт. наблюдали *in vitro* цитотоксические эффекты наночастиц диоксида серебра и наночастиц титана на клеточные линии человека и мышей. [36]. Точно так же было обнаружено, что золотые наночастицы также цитотоксичны в различных клеточных линиях млекопитающих [37].

1.3.2. Генотоксичность

Генотоксичность - это свойство веществ повреждать клетки путем взаимодействия с генетическим материалом клетки. Повреждение генетического материала может вызвать мутации или повреждения ДНК, которые могут вызвать гибель клеток, а также приводить к канцерогенезу. Наночастицы, благодаря наличию размеров в нанометровом диапазоне, могут легко пересекать ядерную мембрану и взаимодействовать с генетическим материалом. Они могут непосредственно диффундировать через ядерную мембрану или транспортироваться через ядерный комплекс пор, а после локализации в ядре взаимодействовать с ДНК или ДНК-родственными белками, что может привести к повреждению ДНК. Генетические повреждения могут возникать либо через первичные (прямые или косвенные), либо через вторичные механизмы [38]. Прямое повреждение ДНК - это локализация наночастиц в ядре клетки, обеспечивающая возможность взаимодействия и повреждения ДНК. Это может привести к мутациям или образованию повреждений ДНК из-за подверженной ошибкам репарации, физических разрывов нитей или мутаций сдвига кадров [39]. Хотя, с другой стороны, считается, что косвенная генотоксичность вызвана вовлечением окислительного стресса в качестве ключевой причины повреждения ДНК. Вторичная генотоксичность обозначается *in vivo* как результат механистического хронического воспаления, вызванного активацией /рекрутированием иммунных клеток, таких как макрофаги и/или нейтрофилы. Повреждающий потенциал ДНК различных наночастиц на основе металлов очевиден из различных исследований, включающих металлические наночастицы, такие как золото, серебро, кобальт-хром, оксидные наночастицы металла, такие как диоксид титана, оксидные наночастицы цинка, железа, кремнеземные наночастицы и фуллерены. Кроме того, сообщалось, что квантовые точки также вызывают фрагментацию ДНК [33]. Ahamed и др. сообщили о генотоксическом потенциале, обнаружив повышенную регуляцию p53 с помощью NPs оксида меди [40]. Наночастицы

TiO₂ индуцировали одноцепочечные разрывы (SSBs) и окислительные повреждения ДНК и нарушал способность к репарации ДНК путем взаимодействия с нуклеотидными путями эксцизионной репарации и репарации оснований [41]. Считается, что НПВ способствуют повреждению через другие молекулы, которые либо обладают способностью взаимодействовать с ДНК для индуцирования повреждений, либо мешают репликации ДНК и делению клеток (например, белки, связанные с клеточным циклом, повреждение репликации ДНК или репаративных ферментов и/или окислительный стресс) [38].

1.3.3. Терратогенность

Наночастицы могут влиять на генетический материал различными способами, такими как повреждение ДНК, хромосомные aberrации и генетические мутации, доказывающие токсический потенциал наночастиц. Различные исследования НПВ с использованием дрозофилы предполагают, что наночастицы оказывает пагубное влияние на развитие на клеточном, молекулярном, генетическом и поведенческом уровнях. Воздействие наночастиц на эмбриональном уровне изменяет процесс развития и приводит к изменению внутриутробного развития [42].

Наночастицы могут взаимодействовать с ДНК, вызывая вредные эффекты, связанные с раком, бесплодием и генетическими нарушениями в течение последующих поколений, когда поражаются зародышевые клетки. наночастицы, благодаря своим небольшим размерам, проникают в ядро через ядерную пору и вмешиваются в процесс митоза, нарушая ДНК, организованную в хроматин или хромосому, тем самым вызывая генетическое повреждение [39].

Личинки, вскормленные наночастицами TiO₂, демонстрируют дефектное ползающее поведение, свидетельствующее о нарушении нервной системы. Снижение массы тела, неполноценное поведение, дефекты

связанные с жилкованием крыла и щетинкой наблюдались после воздействия наночастицами TiO₂ [43].

Магнетитовые наночастицы нарушают гомеостаз жизненно важных металлов, таких как Fe, Ca и Cu, которые необходимы для развития [44]. Нарушение уровня Ca ответственно за дефектный эмбриогенез, тогда как измененный уровень Fe препятствует эмбриогенезу, личиночному росту и метаморфозам. Точно так же дисбаланс Cu вызывает снижение роста эмбриона, плода и взрослого человека [45].

Воздействие наночастиц циркония вызывает многочисленные изменения в развитии как личинки, так и взрослой дрозофилы. Наблюдалось снижение количества куколок и общая задержка развития. Фенотипические дефекты включают дефектный глаз (слитый, дезориентированный, пузырчатый омматиидий), потерю щетины, дефектное развитие брюшка вместе с рассеянными черными пятнами и сегментарное обесцвечивание. Дальнейший рисунок жилкования крыла и расположение трихомов крыла сильно пострадали [46].

Задержка развития, снижение процента куколок, дефектное крыло (неполное жилкование), фенотип щетинки (потерянный или сломанный), деформация глаза (грубый глаз с волдырями) были результатом токсичности наночастиц гидроксиапатита на фенотипическом уровне у дрозофилы [47].

Наночастицы Cu, имеющие мириады применений могут индуцировать токсичность у дрозофилы [48]. Наночастицы Cu вызывают задержку развития, снижение продолжительности жизни взрослых и конкуренцию сперматозоидов у дрозофилы. Наночастицы меди приводили к снижению роста мальков, неполноценным метаморфозам, и задержки развития куколки до взрослой стадии [49].

Микротрансферирование углеродных нанотрубок в эмбрион дрозофилы индуцировало повышенную смертность [50].

Воздействие наночастиц ZnO индуцирует стресс и апоптотический ответ у личинок дрозофилы, изменяя экспрессию Hsp70, повышая регуляцию

гена p53 и вызывая повреждение ДНК в гемоцитах личинок [51]. В последнее время токсичность ZnO NP контролировалась в течение четырех последовательных поколений. Воздействие наночастиц ZnO приводило к увеличению процента повреждения ДНК и апоптотических клеток. Фенотипические дефекты, такие как одно крыло, деформированная/сегментированная грудная клетка и отсутствие вентрального нервного шнура, были получены в течение последующих поколений. Все эти дефекты свидетельствуют о мутагенном эффекте наночастиц ZnO при хроническом лечении. Мухи, вылупившиеся после воздействия ZnO, имеют неудачу в развитии на стадии куколки без потомства в последующем поколении [42].

1.3.4. Гормональные дизрапторы

Stelzer и др. показали, что инкубация с золотыми наночастицами приводила к увеличению эстрогена в клетках гранулезы яичников. Внутриклеточные органеллы, такие как митохондрии, участвующие в стероидогенезе, были в значительной степени инфильтрированы и/или повреждены золотыми наночастицами при инкубации клеток. Очевидный эндокринный разрушающий эффект был вызван золотыми наночастицами в клетках гранулезы яичников [52]. Недавнее исследование *in vivo* сообщило, что модифицированный золотые наночастицы повышали уровень тестостерона в плазме крови у самцов мышей, не влияя на фертильность [53].

Экспрессия гена гонадотропин-рилизинг-гормона повышается при хроническом воздействии наночастиц Ag. Таким образом, предполагается, что наночастицы серебра могут усиливать гонадотропин-рилизинг-гормональную сигнализацию и связанную с ней репродуктивную недостаточность [54]. Помимо влияния на репродуктивную функцию, наблюдается также потенциальное влияние на тиреотропин-рилизинг-гормональную сигнализацию [55].

1.3.5. Процессы воспаления

Как только наночастицы попадают в кровоток, они взаимодействуют с иммунными компонентами, включая моноциты, тромбоциты, лейкоциты, нейтрофилы, дендритные клетки и макрофаги. Макрофаги - это первые иммунные клетки, которые взаимодействуют с наночастицами и потенцируют воспалительную реакцию организма, рассматривая их как чужеродные материалы. При их взаимодействии с наночастицами начинается каскад высвобождения цитокинов, который в конечном итоге заканчивается образованием воспаления. Различные цитокины играют роль в продуцировании провоспалительного побочного эффекта при взаимодействии с наночастицами. Наиболее часто встречаются ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α и хемокин ИЛ-8 [38]. Известно, что воздействие наночастиц повышает экспрессию провоспалительных цитокинов в легочной ткани. После пребывания в альвеолах наночастицы могут вызывать воспаление через провоспалительные цитокины, высвобождаемые из эпителиальных клеток и макрофагов. При отсутствии контроля персистирующее воспаление легких может спровоцировать фиброзные изменения и потерю легочной функции. Многостенные углеродные нанотрубки увеличивали уровни ИЛ-1, ИЛ-1 и ИЛ-6 в жидкости BAL и уровни мРНК TNF-, ИЛ-1, ИЛ-6 и CCL2 в тканях легких [56]. Кроме того, наноразмерные частицы оксида железа вызывали воспалительные реакции путем перегрузки фагоцитозной наночастицы в альвеолярных макрофагах [57]. Аналогично, кремнеземные наночастицы показали повышенное высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-8 и TNF- [58].

1.3.6. Влияние на ЦНС

Ученые изучали токсикологическое воздействие наночастиц на различные органы человеческого организма, и особое внимание уделялось токсикологии, связанной с нервной системой. Наночастицы индуцируют нейротоксичность после ингаляции, перорального введения, внутривенного

введения или инъекции [59]. Различные пути имеют различные соответствующие характеристики. Среди этих путей чувствительный нервно-мозговой путь, прямой нервный путь, обходит барьеры, препятствующие проникновению большинства наночастиц в мозг, такие как гематоэнцефалический барьер [60]. Таким образом, транспорт по сенсорному нервно-мозговому пути существенно увеличивает вероятность того, что наночастицы попадут в мозг. Для наночастиц сенсорные нервно-мозговые пути являются прямыми путями с высокой эффективностью переноса, поскольку они обходят барьеры. Среди этих путей обонятельный нервно-мозговой путь является наиболее широко изученным путем [61].

Обонятельная луковица, кора головного мозга, стриатум, гиппокамп, мозжечок и ствол головного мозга являются потенциальными мишенями наночастиц, транспортируемых по сенсорным нервно-мозговым путям [62]. Транспортируемые наночастицы вызывают патологические изменения в головном мозге. Вход наночастиц через сенсорные нервно-мозговые пути вызывает такие нарушения, как пролиферация глиальных клеток, уменьшение количества нейронов [63], разрыхление мозговой ткани и даже некроз [64]. Патологические нарушения мозга зависели от дозы наночастиц. Например, назальное введение более высоких доз наночастиц TiO_2 (5 и 10 мг/кг массы тела) вызывает некроз в головном мозге, в то время как введение более низкой дозы наночастиц TiO_2 (2,5 мг/кг массы тела) приводит только к чрезмерной пролиферации глиальных клеток. Аналогичным образом, Liu и др. предоставляют доказательства в поддержку дозозависимых патологических нарушений мозга, поскольку они также наблюдали увеличение процента сверхпролиферации астроцитов по мере увеличения дозы наночастиц диоксида церия (CeO_2) [65]. Кроме того, для наночастиц, транспортируемых по различным сенсорным нервно-мозговым путям, гиппокамп и кора головного мозга, по-видимому, являются наиболее распространенными целевыми областями, демонстрирующими нарушения во всем мозге [64]. Гиппокамп участвует в обучении и функции памяти, и

нарушение функции гиппокампа может привести к поведенческим аномалиям в памяти и обучении [66].

После переноса по сенсорным нервно-мозговым путям наночастицы потенциально ухудшают функцию мозга, как это было зафиксировано поведенческими тестами [67]. Влияние наночастиц на результаты поведенческих тестов может быть различным. Например, важным фактором является длительность воздействия наночастиц. You и др. оценили разницу в результатах поведенческих тестов, индуцированных интраназально инстиллированными наночастицами SiO₂ в течение 1 месяца и 2 месяцев. Наночастицы SiO₂, вводимые в течение более длительного времени воздействия, вызывали снижение социальной активности, тревожности и обучаемости, а также функций памяти мышей [63]. Помимо продолжительности воздействия наночастиц, еще одним важным фактором является тип. Наночастицы TiO₂, вводимые через языковую инстилляцию, индуцируют больший дефицит обучения и памяти, чем наночастицы ZnO [68].

1.4 Влияние наночастиц на функциональный статус организма

Ряд исследований за последние года показал, что углеродные нанотрубки, попадая в легкие мышей, вызывают фиброз и системные иммунные реакции, образуют уникальные структуры, которые связывают макрофаги и усугубляют аллергические реакции. Жидкие взвеси УНТ вызывают легочное воспаление и фиброз при введении в легкие путем интратрахеальной инстилляции или фарингеальной аспирации [69].

Поскольку УНТ являются одним из наиболее глубоко изученных ENM в отношении астмы, существует большое количество доказательств того, что они могут вызывать аллергические реакции легких непосредственно. Как одностенные, так и многостенные углеродные трубки способны вызывать и ухудшать астму у мышей [70].

Наночастицы диоксида титана могут вызвать несколько характеристик аллергической астмы непосредственно, как *in vivo*, так и *in vitro* [71]. Наночастицы диоксида титана способны усугублять острый колит за счет механизма, включающего воспаление NLRP3 [72]. Также есть данные о том, что воздействие наночастиц диоксида титана способствует изменению структуры и работы сердца у гипертензивных крыс [73].

1.5 Основа токсичности наночастиц

Наночастицы демонстрируют исключительно увеличенное отношение поверхности к объему из-за их сверхмалых размеров. Это свойство обеспечивает этим частицам более быстрый реактивный подход и, следовательно, токсичность. Кроме того, эти наноразмерные частицы обладают сравнительно более высоким и эффективным проникающим потенциалом в тканях человека и растений, чем обычные частицы [6]. Уровни проникновения наночастиц через различные барьеры клеток в основном зависят от размера. Уменьшенный размер экспоненциально увеличивает площадь поверхности, что приводит к более высоким уровням окисления и повреждающей способности ДНК. Повышенный проникающий потенциал наноразмерных частиц связан с более высокой токсичностью, вызывая окислительный стресс, повреждение геномной и митохондриальной ДНК и апоптоз [74]. Например, было обнаружено, что наночастицы серебра индуцируют зависящую от размера цитотоксичность в клетках легких человека из-за значительного высвобождения серебра в клеточной среде [75]. Точно так же наночастицы золота проявляют острую и хроническую токсичность в зависимости от их размера [76]. Клеточное поглощение, механизм взаимодействия и межклеточная стабильность зависят от размера наночастиц, но все же определенная корреляция не может быть установлена на основе доступных исследований. Вкратце можно предположить, что мелкие частицы более склонны к клеточной интернализации и проявляют большую токсичность, чем крупные [77].

Форма наночастиц также играет определенную роль в их токсическом действии. К примеру, наночастицы ZnO в форме наностержней более токсичны для клеток эпителия легких человека (A549) по сравнению со сферическими наночастицами ZnO [78].

Природа наночастиц также играет важную роль в определении токсичности. Наночастицы обладают разнообразной природой с фазами как растворенных, так и отдельных частиц. Различные наночастицы оказывают различное воздействие на сходные ткани. Многие исследования благоприятствуют этому явлению, например, наноразмерные частицы серебра были признаны более токсичными, чем наночастицы CeO₂ для широкого спектра мер токсичности и параметров, выполненных на животных и клеточных моделях [79]. В другом исследовании было обнаружено, что наночастицы серебра индуцируют более высокую токсичность для прозрачных эмбрионов зебры по сравнению с золотыми наночастицами в аналогичном диапазоне размеров и концентраций. Этот существенно отличающийся токсический потенциал, свидетельствует о важности природы, химии и физико-химических свойств наночастиц [80].

Среда, в которой производятся или хранятся наночастицы, также имеет решающее значение для определения их токсичности. Размеры наночастиц могут различаться в зависимости от их ионной силы, что приводит к различной токсичности [81].

Кроме физико-химических свойств наночастиц, способных влиять на их токсичность существует также понятие белковой короны. Взаимодействие наноматериалов с окружающей биологической средой приводит к образованию слоя адсорбированных биомолекул на поверхности наноматериала, что приводит к модификации его свойств и приданию ему новой идентичности [82]. Этот слой биомолекул называют «биомолекулярной короной». Адсорбция белков плазмы и последующее образование белковой короны на поверхности наночастиц - это быстрое событие, которое происходит в течение нескольких секунд после воздействия

наночастиц на биологическую среду [83]. На поверхности наночастиц исходная корона состоит из белков с высокой скоростью ассоциации и высоким содержанием в плазме. Белки, которые связываются с поверхностью наночастиц с высоким сродством и демонстрируют высокие скорости ассоциации, составляют твердую корону и непосредственно взаимодействуют с поверхностью наночастиц. С другой стороны, белки, слабо связанные с поверхностью наночастиц с низким сродством связывания и демонстрирующие низкие скорости ассоциации, образуют «мягкую корону». Взаимодействие белков, присутствующих в мягкой короне, с поверхностью наночастиц происходит опосредованно и медируется через твердую корону. Белки, составляющие мягкую корону, быстро обмениваются из окружающей среды в короткие сроки. Твердая корона более устойчива и плотно связана с наночастицами и считается играющей важную роль во взаимодействии наночастиц с окружающими их клетками [84]. Наличие белковой короны на наночастицах может повлиять на такие факторы как размер и дзета-потенциал наночастиц. Также наличие белковой короны может повлиять на клеточное поглощение наночастиц, клеточный таргетинг, высвобождение терапевтических агентов, биораспределение и токсичность наночастиц [85].

1.6 Разработка защитных мер

В настоящее время отсутствие стандартизированных анализов и аналитических подходов для проверки эпигенетических эффектов наночастиц является причиной для беспокойства.

Создана правовая база для регулирования наноматериалов и применения нанотехнологий в пищевой промышленности. В 2011 г. Европейская комиссия опубликовала рекомендацию по определению наноматериала, а позже, в 2013 году, и законопроект о новых продуктах питания. Кроме того, научный комитет EFSA опубликовал руководство по оценке рисков применения нанонауки и нанотехнологий в области пищевой

отрасли. Точно так же, как и в отношении химической безопасности, стратегия для оценки опасности наноматериалов основана на использовании стандартных тестов рекомендованных руководящими принципами организации экономического сотрудничества и развития [18].

Вместе с тем некоторые организации предложили предварительные предельные значения профессионального облучения для наночастиц. В этом приняли участие Национальный институт охраны труда и гигиены труда США, Британский институт стандартов и Институт охраны труда и гигиены Германии [86].

В дополнение ко всем защитным мерам, нужно вводить регулярное медицинское обследование профессиональных работников. Тестирование может включать изучение уровней маркеров легочных и сердечных заболеваний, маркеров окислительного стресса и воспаления, антиоксидантных ферментов и маркеров доступа к генотоксичности [87].

2 Материалы и методы

2.1 Выделение и культивирование эритроцитов

Выборку некурящих и курящих доноров крови формировали на основе анкетирования (Таблица 1, 2).

Капиллярную кровь суспендировали в стерильном 0,1М ФСБ с 5мМ глюкозой и ЭДТА (0,2 мг/мл), (рН = 7,4), 1: 20, по объему. Эритроциты осаждали центрифугированием, 3000 об/мин, 10 мин. Осадки эритроцитов промывали 0,1М фосфатным буфером с 5мМ глюкозой и ЭДТА (0,2 мг/мл), повторно центрифугируя при 3000 об/мин, 10 мин. Концентрацию клеток определяли в камере Горяева и доводили до 10^7 кл/мл. Эритроциты культивировали в 0,1М ФСБ с 5мМ глюкозой (рН=7,4) в CO₂-инкубаторе при T=37°C, 18 ч.

Таблица 1 – Дополнительная анкета для курильщиков

Вопрос:	Ответ:
Стаж курения	
Количество выкуриваемых сигарет в день	
Количество пачек в месяц	
Количество пачек в год	
Тип выкуриваемых сигарет	
Наличие фильтра	

Таблица 2 – Общая анкета

Вопрос:	Ответ:
Пол	
Возраст	
Наличие наследственных патологий (Сахарный диабет, аутоиммунные заболевания, болезни крови и т. д.)	
Перенесенные инфекционные заболевания (гепатит, полиомиелит и т.д.)	
<p>Особенности питания:</p> <ul style="list-style-type: none"> * В рационе преобладает пища растительного происхождения * В рационе преобладает животного происхождения * Соотношение животной и растительной пищи составляет 1:1 	
<p>Употребление спиртных напитков:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Никогда не употреблял * Редкое употребление слабоалкогольных напитков * Редкое употребление крепких напитков 	
<p>Курение:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Никогда не курил * Курил, но бросил * 1 сигарета в неделю * 1 пачка сигарет в неделю * 5 пачек сигарет в неделю 	

2.2 Получение углеродных наночастиц

Углеродные наночастицы (фуллерены и наноалмазы) были предоставлены сотрудником Института биофизики СО РАН. Наночастицы вносили в клеточную культуру в 3-х концентрациях: 2.5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл.

2.3 Определение жизнеспособности эритроцитов (МТТ-тест)

Использовали модифицированный метод [88] определения жизнеспособности клеток. После завершения инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант удаляли и к полученному клеточному осадку добавляли 200 мкл раствора МТТ (0,25 мг/мл). Пробы инкубировали 4 ч при 37° С.

После завершения инкубации пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант отбрасывали. В полученные клеточные осадки вносили 150 мкл диметилсульфоксида. После полного растворения материала аликвоты (100 мкл) вносили в 96-луночный планшет и определяли оптическую плотность при длине волны 550 нм.

Оптическую плотность контрольных образцов принимали за 100%. Значения экспериментальных проб выражали в % от экстинкции контрольных проб.

2.4 Определение сорбционной емкости эритроцитов *in vitro*

Использовали модифицированный метод определения сорбционной емкости эритроцитов [89]. После завершения инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант отбрасывали. Клеточные осадки суспендировали в 50 мкл 0,9% NaCl и затем вносили 150 мкл 0,0025% раствора метиленового синего в 0,9% NaCl. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Через 10 мин пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Из супернатанта отбирали

аликвоты (100мкл) и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 620 нм.

В холостые пробы вносили 50 мкл 0,9% NaCl и 150 мкл 0,025% раствора метиленового синего. Из супернатанта отбирали аликвоты (100 мкл) и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 620 нм.

Сорбционную емкость выражали в мкг красителя/ 10^6 кл.

2.5 Определение содержания МДА в эритроцитах *in vitro*

Использовали модифицированный метод определения содержания МДА в эритроцитах [90]. Через 18 ч инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант удаляли. Клеточные осадки эритроцитов гемолизировали 100 мкл дистиллированной воды и вносили 100 мкл 10% ТХУ для осаждения белков. Пробы центрифугировали 4000 об/мин, 10 мин. К 100 мкл супернатанта добавляли 50 мкл раствора 0,5% ТБК. В холостые пробы вносили 100 мкл супернатанта и 50 мкл дистиллированной воды.

Пробы инкубировали на водяной бане при 100°C, 15 минут. Из супернатанта отбирали аликвоты (100 мкл) и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 550 нм.

Количество МДА рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, по формуле: $MDA = 0,898E_{550}$ и выражали в $\mu\text{моль}/10^6$ кл.

2.6 Определение осмотической резистентности эритроцитов *in vitro*

Использовали модифицированный метод определения осмотической резистентности эритроцитов [91]. После завершения инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Полный гемолиз эритроцитов проводили в 150 мкл дист.воды в трех повторностях. Экспериментальные варианты эритроцитов суспендировали в

150 мкл 0,45% NaCl и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Пробы центрифугировали, 3000 об/мин, 10 мин.

Из супернатанта отбирали аликвоты 100 мкл и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 500 нм.

Экстинкцию проб, в которых прошел полный гемолиз принимали за 100%. Экстинкцию проб, в которые вносили 0,45% NaCl, выражали в % от варианта с дистиллированной водой. Это значение (%) определяли как степень гемолиза.

2.7 Измерение размераи дзета-потенциала углеродных наночастиц

Суспензии углеродных наночастиц в концентрации 100 мкг/мл и вносили в U-образную капиллярную кювету. Размер и дзета-потенциал углеродных наночастиц измеряли на приборе ZetasizerNanoZS (MalvernInstruments, Великобритания) в красноярском региональном центре коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

2.8 Морфологический анализ

После завершения инкубации клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом. Морфологию клеток анализировали под световым микроскопом (какой микроскоп, страна производитель, где проводились измерения). В каждой пробе анализировали 200 клеток. Численность различных морфологических классов выражали в % от общего числа проанализированных клеток.

2.9 Сканирующая электронная микроскопия

После завершения инкубации эритроциты фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, 2 ч. Эритроциты трижды отмывали от фиксатора 0,1М ФСБ (рН = 7,4). Клетки дополнительно фиксировали 1% OsO₄, 40 мин, после чего клеточные осадки 4 раза промывали 0,1 М ФСБ (рН = 7,4). На следующей стадии проводили дегидратацию эритроцитов в растворах

этилового спирта с возрастающей концентрацией (10% - 100%, с шагом 10%).

Морфологию клеток анализировали с помощью микроскопа ТМ-3000 (Hitachi, Япония) в красноярском региональном центре коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

2.10 Статистическая обработка результатов

По результатам исследований была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ. Так как распределение показателей отклонялось от нормальных, для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия между группами и значимость взаимосвязей показателей считались достоверными при значении для $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждения

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 30 по 47 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Schulte, P. Occupational Risk Management of Engineered Nanoparticles / P. Schulte [etc] // *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. – 2008. – V.5(4). – P. 239–249.
2. Bergamaschi, E. Occupational exposure to nanomaterials: Present knowledge and future development / E. Bergamaschi // *Nanotoxicology*. – 2009. – V.3(3). – P. 194–201.
3. Tsuji, J. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: Risk assessment of nanoparticles / J. Tsuji [etc] // *Toxicological Sciences*. – 2006. – V.89(1). – P. 42–50.
4. He, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles / C. He [etc] // *Biomaterials*. – 2010. – V.31(13). – P. 3657–3666.
5. Sufian, M.M. Safety issues associated with the use of nanoparticles in human body / M.M. Sufian [etc] // *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*. 2017/ V.19 P 67-72/ – 2017. – V.19. – P. 67–72.
6. Sajid, M. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects / M. Sajid [etc] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – V. 22. – P. 4122–4143.
7. Vance, M. E. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory / M. E. Vance [etc] // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. – 2015. – V. 6(1). – P. 1769–1780.
8. Baughman, R.H. Carbon nanotubes-the route toward applications / R.H. Baughman [etc] // *Science*. – 2002. – V. 297. – P. 787–792.
9. Huizar, I. The role of PPAR in carbon nanotube-elicited granulomatous lung inflammation / I. Huizar [etc] // *Respiratory Research*. – 2013. – V. 14. – P. 14–17.

10. Ma, G.-H. Heal, fuel, and feed the world: advances in nanobiotechnology / G.-H. Ma, D. Wang // *Small*. – 2016. – V. 12(34). – P. 4589–4589.
11. Kwon, S. J. DNA analysis by application of pt nanoparticle electrochemical amplification with single label response / S. J. Kwon, A. J. Bard // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – V. 134(26). – P. 10777–10779.
12. Youns, M. Therapeutic and diagnostic applications of nanoparticles / M. Youns [etc] // *Current Drug Targets*. – 2011. – V. 12(3). – P. 357–365.
13. Cheng, Y. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy / Y. Cheng [etc] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2014. – V.66. – P. 42–57.
14. Eleftheriadou, M. Nanotechnology to the rescue: using nano-enabled approaches in microbiological food safety and quality / M. Eleftheriadou [etc] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2017. – V.44. – P. 87–93.
15. Anjum, M. Remediation of wastewater using various nano-materials / M. Anjum [etc] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2016. – V.12(8). – P.4897–4919.
16. Stark, W. J. Industrial applications of nanoparticles / W. J. Stark [etc] // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – V.44(16). – P.5793–5805.
17. Mura, S. 2013. Advances of nanotechnology in agro-environmental studies / S. Mura [etc] // *Italian Journal of Agronomy*. – 2013. – V.8. – P.127–140.
18. Smolkova, B. Nanoparticles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health / B. Smolkova [etc] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – V.77. – P.64–73.
19. Kah, M. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues / M. A. Kah [etc] // *Nature Nanotechnology*. – 2018. – V.13. – P.677–684.
20. Chhipa, H. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture / [H. Chhipa] // *Environmental Chemistry Letters*. – 2017. – V.15. – P.15–22.

21. Usman, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities / M. Usman // *Science of the Total Environment*. – 2020. – V.721. – P.3–59.
22. Katz, L. M. Nanotechnology in cosmetics / L. M. Katz // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – V.85. – P.127–137.
23. Wolfram, J. Safety of nanoparticles in medicine / J. Wolfram [etc] // *Current Drug Targets*. – 2015. – V.16(14). – P.1671–1681.
24. Petros, R.A. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications / R.A. Petros, J.M. DeSimone // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2010. – V.9(8). – P.615–627.
25. Ferrari M. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers / M. Ferrari // *Trends Biotechnology*. – 2010. – V.28(4). – P.181–188.
26. Volkov, Y. Quantum dots in nanomedicine: Recent trends, advances and unresolved issues // Y. Volkov // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – V.468. – P.419–427.
27. Carabineiro, S. Applications of gold nanoparticles in nanomedicine: Recent advances in vaccines / S.Carabineiro // *Molecules*. – 2017. – V. 22. – p. 857.
28. Rollerova, E. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development / E. Rollerova [etc] // *Endocrine Regulations*. – 2015. – V.49(2). – P.97-112.
29. Matteis, V.D. Toxicityassessment in the nanoparticle era / V.D. Matteis [etc] // *Cellular and molecular toxicology of nanoparticles*. – 2018. – V.1048. – P.1-19.
30. Borm, P. J. A. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery / P. J. A. Borm, W. Kreyling // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2004. – V.4(5). – P.521-531.

31. Ram, P. Nanotechnology in sustainable agriculture: Present concerns and future aspects / P. Ram [etc] // African Journal of Biotechnology. – 2014. – V.13(6). – P.705-713.
32. Heringa, M. B. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations / M. B. Heringa [etc] // Nanotoxicology. – 2016. – V.10. – P.1515-1525.
33. Saifia, M. A. Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles / M. A. Saifia [etc]// Pharmaceutical Nanotechnology. – 2018. – V.6. – P.3-16.
34. Kusaczuk, M. Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells / M. Kusaczuk [etc] // International Journal of Nanomedicine. – 2018. – V.13. – P.2279-2294.
35. Ahmed, B. Mitochondrial and Chromosomal Damage Induced by Oxidative Stress in Zn²⁺ Ions, ZnO-Bulk and ZnO-NPs treated Allium cepa roots / B. Ahmed [etc] // Scientific Reports. – 2017. – V.7(1). – P.1-14.
36. Asare, N. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells / N. Asare [etc] // Toxicology. – 2012. – V.291. – P.65-72.
37. Lopez-Chaves, C., Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies / C. Lopez-Chaves [etc] // Nanomedicine. – 2018. – V.14(1). – P.1-12.
38. Evans, S.J. Critical review of the current and future challenges associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity / S. J. Evans [etc] // Mutagenesis. – 2017. – V.32(1). – P.233-241.
39. Magdolenova, Z. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles / Z. Magdolenova [etc] // Nanotoxicology. – 2014. – V.8(3). – P.233-278.

40. Ahamed, M. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells / M. Ahamed [etc] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2010. – V.396(2). – P.578-583.

41. Charles, S. Assessment of the in vitro genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in a regulatory context / S. Charles [etc] // Nanotoxicology. – 2018. – V.12(4). – P.357-374.

42. Anand, A. S. Chronic exposure of zinc oxide nanoparticles causes deviant phenotype in drosophila melanogaster / A. S. Anand [etc] // Journal of Hazardous Materials. – 2017. – V.327. – P.180-186.

43. Sabat, D. Investigation of titania nanoparticles on behaviour and mechanosensory organ of drosophila melanogaster / D. Sabat [etc] // Physiology and Behavior. – 2016. – V.167. – P.76-85.

44. Chen, H. Oral magnetite nanoparticles disturb the development of drosophila melanogaster from oogenesis to adult emergence / H. Chen [etc] // Nanotoxicology. – 2015. – V.9(3). – P.302-312.

45. Barik, B. K. Nanoparticles as a potential teratogen: a lesson learnt from fruit fly / B. K. Barik and M. Mishra // Nanotoxicology. – 2018. – V.13. – P.258-284.

46. Mishra, M. Oral intake of zirconia nanoparticle alters neuronal development and behaviour of drosophila melanogaster / M. Mishra [etc] // Journal of Nanoparticle Research. – 2017. – V.19. – P.281-294.

47. Pappus, S. A. A Toxicity assessment of hydroxyapatite nanoparticles on development and behaviour of drosophila melanogaster / S. A. Pappus [etc] // Journal of Nanoparticle Research. – 2017. – V.19. – P.136-152.

48. Carmona, E. R. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in drosophila melanogaster / E. R. Carmona [etc] // Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2015. – V.791. – P.1-11.

49. Alaraby, M. A. New insights in the acute toxic/genotoxic effects of copper nanoparticles in the in vivo drosophila model / M. A. Alaraby [etc] // *Nanotoxicology*. – 2016. – V.10(6). – P.749-760.

50. Vega-Alvarez, S. Tissue-specific direct microtransfer of nanomaterials into drosophila embryos as a versatile in vivo test bed for nanomaterial toxicity assessment / S. Vega-Alvarez [etc] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. – V.9. – P.2031-2041.

51. De Melo Reis, E. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test / E. De Melo Reis [etc] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – V.84. – P.55-63.

52. Stelzer, R. Gold nanoparticles enter rat ovarian granulosa cells and subcellular organelles, and alter in-vitro estrogen accumulation / R. Stelzer, R. J. Hutz // *Journal of Reproduction and Development* – 2009. – V.55. – P.685-690.

53. Li, W.-Q. Gold nanoparticles elevate plasma testosterone levels in male mice without affecting fertility / W-Q. Li [etc] // *Small*. – 2012. – V.9. – P.1708-1714.

54. Eom, H. Oxidative stress signaling pathways involved in toxicity of silver nanoparticles and titanium dioxide nanoparticles in the soil nematode *Caenorhabditis elegans* / H. Eom [etc] // *Chemosphere*. – 2011. – V.108. – P.343-352.

55. Hinthner, A. Nanometals induce stress and alter thyroid hormone action in amphibia at or below north american water quality guidelines / A. Hinthner [etc] // *Environmental Science & Technology*. – 2010. – V.44. – P.8314-8321.

56. Dong, J. Pathologic and molecular profiling of rapid-onset fibrosis and inflammation induced by multi-walled carbon nanotubes / J. Dong [etc] // *Archives of Toxicology*. – 2015. – V.89(4). – P.621-633.

57. Liu, L. Impact of Morphology on Iron Oxide Nanoparticles-Induced Inflammasome Activation in Macrophages / L. Liu [etc] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2018. – V.10(48). – P.41197-41206.

58. Stan, M. S. Silicon-based quantum dots induce inflammation in human lung cells and disrupt extracellular matrix homeostasis / M. S. Stan [etc] // The FEBS Journal. – 2015. – V.282. – P.2914-2929.

59. Ou, L. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms / L. Ou [etc] // Particle and Fibre Toxicology. – 2016. – V.13. – P.57-81.

60. Facciola, A. Carbon nanotubes and central nervous system: environmental risks, toxicological aspects and future perspectives / A. Facciola [etc] // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2019. – V.65. – P.22-30.

61. Lin, Y. Neurotoxicity of nanoparticles entering the brain via sensory nerve-to-brain pathways: injuries and mechanisms / Y. Lin [etc] // Archives of Toxicology. – 2019. – V.94. – P.1479-1495.

62. Maher, B. A. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain / B. A. Maher [etc] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – V.113. – P.10797-10801.

63. You, R. Silica nanoparticles induce neurodegeneration-like changes in behavior, neuropathology, and affect synapse through MAPK activation / R. You [etc] // Particle and Fibre Toxicology. – 2018. – V.15. – P.28-46.

64. Liang, H. Neuroinflammation is induced by tongue-instilled ZnO nanoparticles via the Ca²⁺-dependent NF- κ B and MAPK pathways / H. Liang [etc] // Particle and Fibre Toxicology. – 2018. – V.15. – P.28-46.

65. Liu, Y. Acute changes in murine hippocampus and olfactory bulb after nasal instillation of varying size cerium dioxide particles / Y. Liu [etc] // Journal of Toxicology and Environmental Health. – 2016. – V.79. – P.869-877.

66. Voss, J.L. A closer look at the hippocampus and memory / J. L. Voss [etc] // Trends in Cognitive Sciences. – 2017. – V.21. – P.577-588.

67. Fu, J. Silica nanoparticle exposure during the neonatal period impairs hippocampal precursor proliferation and social behavior later in life / J. Fu [etc] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – V.13. – P.3593-3608.

68. Aijie, C. Central neurotoxicity induced by the instillation of ZnO and TiO₂ nanoparticles through the taste nerve pathway / C. Aijie [etc] // *Nanomedicine*. – 2017. – V.12. – P.2453-2470.

69. Bonner, J. C. Nanoparticles as a potential cause of pleural and interstitial lung disease / C. J. Bonner // *Proceedings of the American Thoracic Society*. – 2010. – V.7(2). – P.138-141.

70. Ihrie, M. D. The toxicology of engineered nanomaterials in asthma / M. D. Ihrie, J. C. Bonner // *Current Environmental Health*. – 2018. – V.5. – P.100-109.

71. Ahn, M-H. Titanium dioxide particle – induced goblet cell hyperplasia: association with mast cells and IL-13 / M-H, Ahn [etc] // *Respiratory Research*. – 2005. – V.6. – P.34-43.

72. Ruiz, P. A. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis: role of the NLRP3 inflammasome / P. A. Ruiz [etc] // *Inflammatory bowel disease*. – 2016. – V.66(7). – P.1216-1224.

73. Rossi, S. Subchronic exposure to titanium dioxide nanoparticles modifies cardiac structure and performance in spontaneously hypertensive rats / S. Rossi [etc] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2019. – V.16(1). – P.25-43.

74. Karlsson, H. L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size / H. L. Karlsson [etc] // *Toxicology Letters*. – 2009. – V.188(2). – P.112-118.

75. Gliga, A. R. Sizedependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release / A. R. Gliga [etc] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2014. – V.11. – P.11-28.

76. Bozich, J. S. Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna* / J. S. Bozich [etc] // *Environmental science*. – 2014. – V.1(3). – P.260-270.

77. Shang, L. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters / L. Shang [etc] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2014. – V.12. – P.115-116.

78. Hsiao, I.-L. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells / I.-L. Hsiao, Y.-J. Huang // *The Science of the Total Environment*. – 2011. – V.409(7). – P.1219-1228.

79. Gaiser, B. K. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles / B. K. Gaiser [etc] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2012. – V.31(1). – P.144-154.

80. Bar-Ilan, O. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos / O. Bar-Ilan [etc] // *Small*. – 2009. – V.5(16). – P.1897-1910.

81. Kittler, S. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions / S. Kittler [etc] // *Chemistry of Materials*. – 2010. – V.22(16). – P.4548-4554.

82. Walczyk, D. What the cell “sees” in bionanoscience / D. Walczyk [etc] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – V.132. – P.5761-5768.

83. Tenzer, S. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology / S. Tenzer [etc] // *Nature Nanotechnology*. – 2013. – V.8. – P.772-781.

84. Maiolo, D. Surfactant titration of nanoparticle–protein corona / D. Maiolo [etc] // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V.86. – P.12055-12063.

85. Ahsan, S. M. Nanoparticle-protein interaction: the significance and role of protein corona / S. M. Ashan [etc] // *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*. – 2016. – V.75. – P.196-202.

86. Kabir, E. Environmental impacts of nanomaterials / E. Kabir [etc] // Journal of Environmental Management. – 2018. – V.225. – P.261-271.

87. Liao, H.-Y. Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials / H.-Y. Liao [etc] // Nanotoxicology. – 2014. – V.8. – P.100-110.

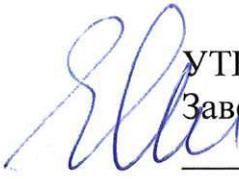
88. МТТ assay protocol: [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://www.abcam.com/kits/mtt-assay-protocol>.

89. Пат. 2492486 Российская Федерация, МПК G01N 33/52. Способ оценки сорбционной емкости клетки / В. Г. Горохова; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НЦРВХ" СО РАМН. – № 2012125089/15; заявл. 15.06.12, опубл. 10.09.13, Бюл. № 25. – 7 с.

90. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови / А.В. Дерюгина, А.С. Корягин, С.В. Копылова, М.Н. Таламанова. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета, 2010. – 25 с.

91. Пат. 2328741 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ определения осмотической резистентности эритроцитов / М. А. Горшкова; заявитель и патентообладатель "Тверская государственная мед. академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию". – № 2007116258/15; заявл. 28.04.07; опубл. 10.07.08; Бюл. № 19. – 6 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии


УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е.И. Шишацкая
подпись инициалы, фамилия
« 10 » июля 2020 г.

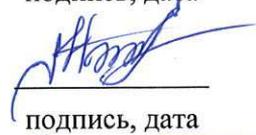
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Изучение биологической активности углеродных наночастиц в культуре

in vitro

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Руководитель	 подпись, дата	профессор, д-р. биол. наук должность, ученая степень	<u>Е. И. Шишацкая</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата		<u>О.Р. Максимова</u> инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	профессор, д-р. биол. наук должность, ученая степень	<u>В. С. Бондарь</u> инициалы, фамилия
Консультант	 подпись, дата	доцент, канд. биол. наук должность, ученая степень	<u>Н. Г. Мензянова</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2020