

На правах рукописи



АБРАМЕНКО НАТАЛИЯ БОРИСОВНА

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

02.00.04 - физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Кустов Леонид Модестович
доктор химических наук, профессор

Москва – 2017

Содержание

Введение.....	4
1. Литературный обзор.....	11
1.1. Наноматериалы и нанотехнологии. Специфика наночастиц металлов: свойства и применение.....	11
1.2. Методы получения наноразмерных частиц металлов.....	13
1.3. Экспериментальные методы исследования наночастиц.....	15
1.4. Методы оценки токсичности наночастиц.....	16
1.5. Механизмы токсического воздействия наночастиц на клетки и живые организмы.....	18
1.6. Влияние физико-химических свойств и характеристик наночастиц на их токсичность.....	21
1.7. Моделирование токсичности наноматериалов.....	25
2. Экспериментальная часть.....	36
2.1. Объекты исследования.....	36
2.2. Реагенты и материалы.....	37
2.3. Методики получения водных суспензий наночастиц серебра.....	37
2.4. Физико-химические методы исследования наночастиц.....	39
2.5. Экспериментальные методы оценки токсичности наночастиц с использованием гидробионтов.....	41
2.5.1 Тест-объект — водоросли <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer	42
2.5.2 Тест-объект — двустворчатые моллюски <i>Unio Tumidus</i>	42
2.5.3 Тест-объект — плоские черви планарии <i>Jirardia tigrina</i>	43
2.5.4 Тест-объект — пресноводные рачки <i>Daphnia magna</i>	44
2.5.5 Тест-объект — рыбы <i>Danio rerio</i>	45
2.6. Моделирование токсичности наночастиц.....	46
3. Результаты и обсуждение.....	52
3.1. Суспензии наночастиц серебра.....	52

3.2.	Физико-химические свойства и характеристики наночастиц после их получения и в условиях эксперимента.....	54
3.3.	Агрегативная устойчивость и поведение наночастиц в экспериментальной среде. Дестабилизация плоских наночастиц серебра.....	60
3.4.	Предварительные тесты с образцами коммерческих наночастиц серебра Agbion. Отработка методик и выбор объектов исследований.....	63
3.5.	Экотоксичность наночастиц серебра в отношении гидробионтов.....	75
3.6.	Моделирование токсичности наночастиц с использованием базы данных ОСНЕМ.....	89
4.	Заключение.....	96
5.	Выводы.....	99
	Список сокращений.....	101
	Список литературы.....	103

Введение

Актуальность исследования

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

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

Рост объемов производства НМ и их успешное внедрение вызывают естественные опасения по поводу проявления специфических наноразмерных эффектов для живых организмов. Растущее применение НМ неизбежно ведет к увеличению вероятности воздействия НМ на людей и живые организмы. Так, воздействие НМ на человека потенциально возможно на самых разных этапах работы с НМ, на стадиях производства, транспортировки, хранения, использования и утилизации [1]. Потери или унос НМ на любой из этих стадий может приводить к их попаданию в окружающую среду. Вполне вероятно, что широкое применение НМ в технике и в быту может быть сопряжено с их попаданием в водную среду в составе стоков из очистных сооружений и

последующему накоплению в донных отложениях, что в итоге может приводить к дальнейшему распространению НМ в водной растительности и в живых организмах. Это, в свою очередь, может привести к их последующему распространению в окружающей среде и попаданию в организмы более крупных живых существ, включая человека.

Широкое распространение НЧ вызывает опасение по поводу специфического наноразмерного эффекта для живых организмов. Вероятный сценарий негативного воздействия НЧ на живые организмы и человека, был проанализирован в нескольких исследованиях [2, 3, 4]. Тем не менее, вопрос о безопасности внедрения нанопродукции в технологии и товары широкого потребления остается открытым. На сегодняшний день мы обладаем недостаточной научной информацией по токсичности НЧ в отношении живых организмов, чтобы сделать окончательные выводы об их безопасности. В связи с этим, возможное влияние применяемых нанотехнологий на окружающую среду делает крайне актуальным необходимость полномасштабного изучения биологической безопасности НЧ с учетом всех их физико-химических свойств и иных характеристик [5, 6].

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

Следует заметить, что в последнее время фронт экспериментальных исследований по токсичности НЧ заметно отстает от быстрого прогресса нанотехнологий [7, 8]. Между тем, существует и успешно применяется в органической и фармацевтической химии недорогая и эффективная альтернатива экспериментальным тестам на токсичность - это компьютерное моделирование и прогнозирование негативного воздействия на биологические объекты, которые основаны на корреляционной зависимости «структура-свойство». При анализе

свойств НЧ как экотоксикантов использование такого подхода позволяет резко сократить число экспериментов и тем самым оперативно получать необходимые сведения. Подобные методы в последние годы все чаще применяются в работах, связанных именно с оценкой токсичности НЧ.

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

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

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

Целью данной работы являлось установление связи между биологической активностью серебряных НЧ в отношении некоторых гидробионтов и характеристиками таких наночастиц, а также разработка математических моделей, описывающих токсичность НЧ в зависимости от их основных физико-

химических и других характеристик, и оценка релевантности разработанных моделей с экспериментальными результатами.

Объектами исследования в настоящей работе были выбраны НЧ серебра различной формы и сферические НЧ, при этом стабилизированные веществами различной природы. В качестве биологических объектов были использованы водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, двухстворчатые моллюски *Unio tumidus*, плоские черви планарии *Jirardia tigrina*, пресноводные рачки *Daphnia magna*, развивающаяся икра рыб *Danio rerio*.

Задачи исследования заключались в следующем:

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

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

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

4 Найти оптимальную совокупность характеристик НЧ (Me и Me_2O_x) для описания их структуры и разработки математических моделей токсичности неорганических НЧ. Провести оценку адекватности полученных моделей на экспериментальных результатах.

Научная новизна

Разработаны оригинальные методики оценки токсичности НМ с использованием планарий и моллюсков. Впервые проведено тестирование коммерческих НЧ серебра Agbion на пяти видах гидробионтов. Проанализировано влияние формы НЧ и используемого стабилизатора на свойства НЧ и их

токсичность в отношении эмбрионов рыб. Впервые проведен анализ токсичности широкого спектра стабилизаторов и установлен их вклад в токсичность суспензий НЧ.

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

Научная и практическая значимость работы

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

Положения, выносимые на защиту

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

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

3. Использование физико-химических и других характеристик НЧ в качестве дескрипторов позволяет описать строение НЧ и разрабатывать модели QSAR для достоверного представления токсичности НЧ.

Личный вклад автора состоит в поиске, анализе и обобщении научной информации по способам синтеза НЧ, их биологической активности, а также в выборе наиболее перспективных подходов к моделированию токсичности НЧ.

Автором проведён основной эксперимент по характеристике физико-химических свойств НЧ и их токсичности для гидробионтов. Диссертант самостоятельно интерпретировала результаты исследования наночастиц серебра различными физико-химическими методами (ПЭМ, DLS, NTA, AAS, УФ - спектроскопия). Автор принимала участие в планировании и постановке конкретных задач диссертации на всех этапах её выполнения, в обсуждении результатов, подготовке публикаций и докладов. Синтез НЧ серебра, стабилизированных поверхностно-активными веществами различной природы, был выполнен совместно с сотрудниками лаборатории химии поверхности, химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Формирование и наполнение базы данных по токсичности НЧ и моделирование проведены совместно с сотрудниками Института биоорганической химии и нефтехимии НАН (Украина) и научно-исследовательского центра Helmholtz Zentrum München (Германия).

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

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

Степень достоверности и апробация работы

Основное содержание работы изложено в 15 публикациях (из них 4 статьи в журналах, 1 статья в сборнике и 10 тезисов докладов). Результаты работы были представлены в виде устных сообщений и тезисов докладов на конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014), Conference Munich Interact 2012 (Munich, Germany, 2012); 1st International Symposium "Nanomaterials and Environment" (Moscow, 2013); ECO Final Conference 2013 (Germany, 2013); International Congress on Safety of

Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies, SENN 2015 Conference (Helsinki, Финляндия, 2015); 2nd International Symposium "Nanomaterials And Environment" (Moscow, 2015); Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2015) (Toulouse, France, 2015); NANOCON 2015. (Czech. Republic, 2015), 3rd International Symposium "Nanomaterials and Environment" (Moscow, 2016), International Symposium "Nanostructured adsorbents and catalysts" (Moscow, 2016).

1. Литературный обзор

1.1. Наноматериалы и нанотехнологии. Специфика наночастиц металлов: свойства и применение

По сравнению с обычными веществами НМ обладают уникальными и полезными свойствами, что обеспечивает их широкое применение в промышленности. Использование НМ в коммерческих продуктах неуклонно расширяется [9]. Растущее число применений НМ приближается к 2000, при этом серебряные НЧ представляют большую часть продукции nanoиндустрии (24% от общего числа продукции) [10].

Наноматериалы применяют в постоянно возрастающем числе коммерческих областей, включающих антибактериальные покрытия, косметические товары, электронику, высокотехнологические материалы, пищевые технологии, фармацевтику и медицину, системы очистки и фильтрации, сельское хозяйство и энергетику [11, 12]. В Таблице 1 представлен краткий перечень наиболее часто встречающихся НМ в различных товарах [13].

На сегодняшний день нанотехнологии представляют одну из ключевых областей инновационных разработок и научных исследований [14]. Благодаря своим малым размерам, а также большой удельной поверхности и соотношению площади к объему частицы, НЧ обладают специфическими физико-химическими свойствами, по сравнению с их макроскопическими аналогами, что дает им преимущества с точки зрения электропроводимости, реакционной способности и оптических свойств [11].

Известно, что размеры частиц оказывают существенное влияние на их электрохимический потенциал [15, 16], определяют их химическую активность и процессы агрегации [17,18]. С уменьшением размера частиц существенно возрастает доля атомов, находящихся на поверхности, что, в свою очередь, приводит к увеличению вклада поверхностных атомов в свободную энергию системы [19].

Таблица 1. Области наиболее распространенного применения НМ

Наноматериал	Практическое применение
Ag	Бактерицидные препараты, косметика, средства личной гигиены, одежда, обработка ран, упаковка пищевых продуктов, пищевые добавки, дезинфекция воды, медицинские цели
Cu (CuO)	Катализ, электроника, проводящие материалы, добавки при спекании, высокотеплопроводные материалы
TiO ₂	Солнечные батареи, антибактериальные покрытия, чистящие средства, краски
ZnO	Солнечные батареи, полупроводники, пищевые контейнеры и добавки, покрытия, полимерные фильтры, УФ фильтры, антибактериальные препараты
Si (SiO ₂)	Краски, чистящие средства, косметика, пищевые добавки, спортивные товары, элементы электронных устройств
Au	Косметика, средства личной гигиены, топливные элементы, продукты питания и пищевые добавки, диагностика и терапия онкологических болезней
C, включая C ₆₀ , C ₇₀	Спортивные товары, устройства фильтрации и хранения данных, светодиоды, косметика, компьютерное оборудование

Для НМ отмечают проявление большей твердости, жесткости, высокой термической стабильности, гибкости и пластичности. Так, прочность нанокристаллического никеля на пять порядков превышает прочность соответствующего микрокристаллического никеля [20]. Следует отметить, что наблюдаемая прочность кристаллических НМ сопровождается потерей пластичности, что в ряде случаев ограничивает их применения [21]. Тем не менее, некоторые из нанокристаллических материалов имеют возможность претерпевать

значительное удлинение и пластическую деформацию без разрушения, даже при увеличении линейных размеров на 100-300%. Такие особенности и сверхпластичные свойства были отмечены для НЧ металлов, таких, как алюминий, магний, железо, титан, и НЧ интерметаллидов, в частности, на основе железа, никеля и титана [22].

Исходя из широкого перечня товаров, получаемых с применением НМ, можно говорить о достаточно больших масштабах внедрения нанотехнологий в современном обществе, что, в свою очередь, поднимает острый вопрос о безопасности использования НМ не только в производстве, но и в повседневной жизни. К сожалению, исследования, связанные с безопасностью НМ, до сих пор находятся на ранней стадии развития, и имеется еще много «белых пятен» в понимании последствий распространения НМ в экологическом пространстве.

1.2. Методы получения наноразмерных частиц металлов

Вполне очевидно, что большое значение имеют данные о методах получения НЧ, так как они во многом определяют свойства и морфологию образующихся частиц, что, в свою очередь, может оказывать влияние на их биоаккумуляцию, распространение и токсичность для окружающей среды. Основной трудностью при получении НМ является контроль их основных свойств, таких как размер, распределение по размерам, форма частиц, химический состав и кристаллическая структура.

К настоящему времени разработано большое число разнообразных методов синтеза и стабилизации наноразмерных частиц. Все методы можно разделить на несколько категорий: так называемые методы top-down и bottom-up, методы «зеленой химии», химические и физические методы.

В основе метода top-down лежит получение изолированных атомов путем диспергирования грубодисперсных частиц. В категорию методов top-down входят различные физические методы, в частности, перемалывание, измельчение и фотолитография [23]. На ранних этапах исследования ультрамалых частиц металлов, преобладали методы их получения путем диспергирования

грубодисперсных частиц с применением коллоидных мельниц, ультразвукового, высокочастотного и электродугового дробления или других аналогичных приемов. Этими способами получают, как правило, достаточно крупные частицы. В последние годы наибольшее распространение получили конденсационные методы синтеза наноразмерных частиц, включающие испарение, распыление, электронную и лазерную бомбардировки металлов, конденсацию в электрической дуге и в плазме, индукционный нагрев и взрыв, а также другие методы [24, 25]. Кроме того, существует множество методов синтеза НЧ под влиянием физических факторов, в частности, облучение в УФ- и ближнем ИК-диапазонах, воздействие ультразвуком и др. [26].

Большую популярность получили методы bottom-up, которые основаны на химических подходах, в частности, на восстановлении солей металлов, растворенных в воде или в других растворителях, в присутствии различных стабилизаторов. В качестве восстановителей используют самые разные химические соединения, в частности, борогидриды, алюмогидриды, гидразин, гипофосфиты [27, 28], соли щавелевой кислоты, формалин, ацетон и др.

Существенные результаты были достигнуты при использовании электрохимических способов восстановительного получения металлических частиц в растворах. Наночастицы благородных металлов получают также путем нагрева раствора их солей в спирте или другом органическом растворителе. Наличие стабилизатора при получении НЧ методом bottom-up играет существенную роль для контроля размера частиц и формы, а также обеспечения стабильности синтезированных частиц [29].

До недавнего времени определённым недостатком химических методов являлось то, что при их использовании, как правило, получали НЧ металлов с очень широким распределением по размерам. В последние годы достигнуты значительные успехи в направленном синтезе сферических частиц определённого размера с узким распределением и, что особенно интересно, вытянутых частиц, в виде стержней и игл [30, 31].

1.3. Экспериментальные методы исследования наночастиц

Методы анализа НЧ, как правило, направлены на измерение размера частиц, а также на исследование морфологии и поверхностного заряда. Эти характеристики особенно важны, так как они определяют стабильность и распространение НЧ в естественных условиях.

Распределение частиц по размерам и их морфология являются наиболее важными характеристиками НЧ. Морфология и размеры частиц определяются с помощью электронной микроскопии, в частности, с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

В просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) пучок электронов проходит через тонкий (< 100 нм) слой вещества, выдавая информацию о его внутренней микроструктуре. Часть электронов, взаимодействуя с атомами вещества, отклоняется, попадая в систему магнитных линз, которые и формируют на люминесцентном экране изображение внутренней структуры объекта. Методы ПЭМ и СЭМ дают изображения с нанометровым разрешением, позволяющим проводить оценку размера и формы НЧ. Современный метод электронной микроскопии также дает ряд других данных, в частности, сведения об элементном составе.

В отличие от просвечивающих, сканирующие электронные микроскопы дают изображения с прямой визуализацией, сканируя ее с помощью электронного луча, сжатого магнитными линзами до размера порядка 5 нм. После взаимодействия луча с поверхностью образца электроны рассеиваются и попадают на детектор, регистрирующий сигнал и преобразующий его в изображение поверхности. Интенсивность сигнала зависит от рельефа поверхности, размера частиц и их химического состава. Средний размер частиц, получаемый с помощью СЭМ, сравним с результатами, полученными с помощью динамического рассеяния света.

Самым простым режимом работы метода АСМ является измерение рельефа поверхности НМ. АСМ не требует сверхвысокого вакуума и может работать в

обычной воздушной или даже жидкой среде, что позволяет напрямую изучать биологические объекты. АСМ обеспечивает более высокое разрешение, чем СЭМ. К недостаткам АСМ относится медленная скорость сканирования, значительно уступающая таковой в методе СЭМ.

Метод динамического светорассеяния (Dynamic light scattering (DLS)) представляет самый быстрый и популярный метод определения размеров НЧ. DLS широко используется для определения размеров частиц в коллоидных суспензиях нано- и субмикронного диапазонов. В основе метода динамического рассеяния света лежит анализ флуктуаций интенсивности света, рассеянного частицами, находящимися в состоянии хаотического броуновского движения. Метод DLS позволяет получать информацию о гидродинамическом диаметре частиц в растворе. Часто он используется для исследований агрегации НМ в различных средах.

К числу методов изучения НЧ в растворе относится и анализ траекторий НЧ (Nanoparticle tracking analysis (NTA)). В его основе лежит наблюдение за броуновским движением отдельных НЧ, скорость которого зависит от вязкости и температуры жидкости, а также размера и формы НЧ [32]. Метод NTA может применяться для коллоидных растворов частиц размером от 10 до 1000 нм. Диапазон измерения сильно зависит от природы исследуемого образца.

Помимо различных видов микроскопии для исследования нанообъектов используют и другие физико-химические методы, в частности, УФ- и ИК-спектроскопию, масс-спектрометрию. При использовании различных методов они могут дополнять друг друга, так как может появиться необходимость использовать сочетания различных методов для обнаружения и оценки поведения НМ в окружающей среде.

1.4. Методы оценки токсичности наночастиц

При анализе токсических свойств НЧ в отношении биологических объектов, возможны два подхода: на клеточных культурах «in vitro» и на живых организмах «in vivo». Первый подход отличается малыми временными затратами и

возможностью накопления большого количества статистических данных, но ограничен с точки зрения аппроксимации получаемых результатов на реальных живых системах. Он представляет собой исследование модельной системы живого организма, изолированной в рамках эксперимента. Недостатком работы с клеточными структурами является невозможность прогнозирования эффекта на организм как единого целого и проведения анализа распространения и накопления веществ в организме. Вместе с тем, появляется неоднозначность в том, насколько хорошо подобранная модельная система описывает аналогичную систему в живом организме.

Для второго подхода характерны более длительные интервалы проведения наблюдений и меньший размер выборки при постановке эксперимента. Тем не менее, у данного подхода есть большое преимущество перед первым, которое заключается в том, что получаемые результаты лучше переносятся с лабораторных испытаний на естественные условия. При работе с живыми объектами проводится оценка воздействия токсикантов на живой организм в целом, а не на отдельно взятые клеточные системы. Тестирование воздействия НЧ на лабораторных животных позволяет определить восприимчивость данного типа к исследуемому веществу. В виду специфических особенностей те или иные виды могут быть более устойчивы к НЧ, в зависимости от их строения и химического состава. Для воссоздания более реалистичной картины потенциальной экологической токсичности НЧ, желательно проводить масштабное исследование, с использованием различных биологических объектов, представителей растений и животных различных классов.

Изучение воздействия экотоксикантов и НМ на живые организмы и здоровье человека включает набор токсикологических тестов, обязательной составляющей которого является исследование токсичности в водных системах [33, 34]. Среди биологического разнообразия живых организмов обитатели водоемов (гидробионты) рассматриваются как одни из первых видов животных, которые могут контактировать с НМ. Попадание НЧ со сточными водами считается одним из наиболее вероятных путей проникновения НМ в

окружающую среду [35]. При накоплении НЧ естественным путем в водоемах со стоячей водой в таких резервуарах могут достигаться значительные концентрации НЧ. В этом случае важно учитывать влияние НЧ на водные организмы, поскольку они являются стартовой основой трофических цепей, в которых токсические вещества могут накапливаться из почвы и донных отложений и затем поступать в высшие организмы.

Накопленная информация о состоянии НЧ в окружающей среде, об их распространении и влиянии на живые организмы часто бывает противоречива. Для разработки безопасных НМ важно выявить влияние НЧ на природу и здоровье человека, установить основные факторы, определяющие токсичность НЧ, и возможные механизмы воздействия НЧ на живых существ.

1.5. Механизмы токсического воздействия наночастиц на клетки и живые организмы

При взаимодействии НЧ с клетками живых организмов имеют место свои особенности, не типичные для крупнокристаллических аналогов. Данные взаимодействия определяются как условиями окружающей среды, так свойствами самих НЧ и экологическими условиями [36]. Оценив потенциальное воздействие НЧ на человека и окружающую среду, необходимо выяснить, представляют ли НЧ опасность для здоровья человека и живых организмов.

Рассмотрим природу токсичности НЧ на примере серебряных НЧ. Токсичность наносеребра принято сравнивать с показателями токсичности для ионов серебра. Ионы серебра считают одной из самых активных и в то же время токсичных форм серебра в природе. Именно с антимикробной активностью ионов серебра связано широкое применение соединений серебра в качестве дезинфицирующих средств.

Выделяют три основных механизма воздействия НЧ серебра на биологические объекты: 1) токсичность НЧ серебра как функция свойств самих НЧ; 2) НЧ серебра являются источниками ионов серебра, которые и обеспечивают

токсический эффект; 3) комбинированное участие НЧ и ионов серебра в механизме токсичности.

Как известно, НЧ серебра обладают высокой реакционной способностью, и их размеры близки к размерам большинства биологических макромолекул, из чего можно сделать предположения о специфичности взаимодействия НЧ серебра с клетками, по сравнению с ионами серебра. На основании исследований по данной тематике были предложены, по крайней мере, два возможных способа взаимодействия наночастиц серебра с клетками живых организмов [37].

- 1) НЧ серебра размером 1-10 нм адсорбируются на поверхности клеточной мембраны и нарушают ее проницаемость и дыхательную функцию.
- 2) После проникновения внутрь клетки НЧ серебра способны взаимодействовать с серо- и фосфорсодержащими соединениями, в частности ДНК, что приводит к потере репликационной способности.

Действительно в специально проведенных исследованиях было подтверждено, что НЧ серебра способны не только сорбироваться на клеточной мембране, но и проникать через неё внутрь клетки. Первое приводит к нарушению ионного обмена клетки, и, следовательно, к затруднению выхода серебра, прошедшего через мембрану. Проникновение же внутрь клетки приводит к образованию реакционно-способных кислородных частиц [38]. Так были обнаружены изменения мембранно-связанных белков в клетках, обработанных НЧ [39].

Более ясная картина механизма токсического воздействия НЧ серебра была получена при использовании штаммов рекомбинантных биолюминесцентных бактерий, чувствительных к повреждению ДНК, мембраны клетки и окислительному воздействию пероксидных радикалов. В результате исследования было подтверждено, что действие НЧ серебра распространяется на внутреннюю и внешнюю среду клетки. Сгенерированные наночастицами ионы серебра проникают в клетку, где с их помощью образуются свободные радикалы или активные формы кислорода. Более того, мембрана, поврежденная действием НЧ, затрудняет выход ионов серебра из клетки, что является причиной более высокой

токсичности НЧ серебра по сравнению с AgNO_3 , взятым в качестве источника ионов серебра.

Согласно второй версии, токсичность НЧ серебра обусловлена ионами серебра, выделяющимися с поверхности НЧ, что, в свою очередь, напрямую зависит от физико-химических свойств и характеристик НЧ серебра. Ионы серебра способны поражать транспортные белки, формирующие калиевые каналы, что приводит к нарушению их функционирования, а также падению градиента концентраций калия и мембранного потенциала, и, в конечном итоге, к дестабилизации мембраны [40, 41]. В дальнейшем это приводит к перекисному окислению липидов, после чего запускается механизм программируемой смерти клеток – апоптоз [11, 42].

Авторы [43] как раз связывают эмбриотоксичность НЧ серебра с эмиссией ионов серебра с поверхности НЧ. В работе [44] исследователи наблюдали увеличение токсических показателей со временем (данные были получены для клеточной культуры *human mesenchymal stem cells*). Данный эффект они объясняли эмиссией ионов серебра с поверхности НЧ серебра в раствор. По мнению авторов [45], НЧ серебра обладают цитотоксичностью, поскольку являются источником ионов серебра и служат своего рода «системой доставки», за счет закрепления на поверхности клетки, осуществляя выделение серебряных ионов в непосредственной близости от клеточной мембраны, создавая, таким образом, их высокую локальную концентрацию.

Третий предлагаемый механизм токсического действия НЧ серебра объединяет обе выше представленные гипотезы и предполагает, что токсический эффект от наносеребра может быть связан с комбинированным механизмом токсичности, а именно, с эффектом от ионов серебра и специфическими свойствами НЧ серебра [46]. В работах [47, 48] было показано, что сильное биологическое действие НЧ серебра может объясняться совместным действием наночастиц и ионов серебра, образовавшихся в результате частичного распада НЧ серебра в растворе [49].

Вопрос о механизме действия НЧ серебра на живые организмы является одним из наиболее сложных в вопросах токсичности этих НЧ. Механизмы действия серебряных НЧ «in vitro» и «in vivo» до сих пор вызывают много споров и сомнений.

1.6. Влияние физико-химических свойств и характеристик наночастиц на их токсичность

Для получения достоверных данных и корректной интерпретации результатов тестирования НЧ ключевое значение имеет качественное исследование свойств НЧ. Сравнивая крупнокристаллические материалы и НМ одинакового состава, отмечают различия в их физико-химических и токсических характеристиках [50, 51]. Поведение и устойчивость НЧ в средах, используемых для экспериментов, рассматриваются как одни из наиболее важных характеристик при планировании и проведении экологических тестов. При работе с НЧ следует обращать внимание на размер и форму НЧ, их растворимость, способность их перехода в ионное состояние и другие характеристики НЧ [52].

Размер наночастиц

Размер НЧ играет существенную роль при попадании их в клетки, их перемещении и накоплении внутри организма [53]. Много исследований было проведено для выявления токсичности НЧ разного размера, в частности, наночастиц серебра [54, 55, 56], золота [54], кремниевых НЧ [57] и наночастиц никеля [58]. В работе 2009 года авторы [54] наблюдали токсичность НЧ серебра всех размеров в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*. Авторы отметили большую токсичность частиц меньшего размера. По данным авторов [59], меньшие НЧ Ag (10 нм) демонстрировали более существенный токсический эффект для клеток и вместе с тем более высокую внутриклеточную проницаемость серебра по сравнению с частицами крупного размера.

Как показано в [60], частицы золота большого размера, как правило, не проявляют токсических свойств, тогда как НЧ Au с размером 1,4 нм способны

оказывать вредное влияние на клеточные культуры. Анализ литературных данных показывает, что научные дискуссии относительно связи между размером НЧ и оказываемым или токсическим эффектом продолжаются. Так, авторы работы [58] не нашли существенных отличий в значениях LC_{50} для НЧ Ni разного размера по отношению к рыбам *Danio rerio*.

Агрегация наночастиц

Наноматериалы подвергаются различным изменениям при эксплуатации и при попадании в естественную среду [14, 61]. В окружающей среде НЧ могут вести себя по-разному - образовывать агрегаты, растворяться или контактировать с частицами пыли, аэрозолями или природными органическими веществами [62, 63, 64, 65].

При увеличении ионной силы раствора, синтетические НЧ серебра способны образовывать агломераты [66], что в свою очередь сказывается на токсических свойствах НЧ. Более крупные агрегаты легче выводятся клетками макрофагов, чем агрегаты меньшего размера [67]. Аналогичные результаты были получены и в отношении агрегатов НЧ золота, проникающих в клетки [68]. Авторы [69] обнаружили, что механизм агрегации НЧ определяет морфологию и, следовательно, процессы сорбции/десорбции ионов суспензий.

Для водной среды процессы агрегации НЧ и их устойчивости имеют определяющее значение с точки зрения распространения НЧ в среде и их дальнейшей судьбы. Малые агрегаты НЧ могут распространяться на достаточно большие территории и, следовательно, могут представлять опасность для живых организмов, в то же время крупные агрегаты НЧ способны быстрее осаждаться в донных слоях и значительно увеличивать локальную концентрацию вещества [70].

Форма наночастиц

В ряде работ показано, что форма НЧ тоже влияет на их токсические свойства. Были предприняты попытки изучения токсичности НЧ разной формы. В

частности, в работе по исследованию НЧ Ag [71] авторы установили, что частицы в виде нанопластин проявляют большую токсичность, чем сферические НЧ Ag и нанопроволоки в отношении эпителиальных клеток жабр рыб (*RT-W1*) и эмбрионов рыб *Danio rerio*.

Наночастицы золота в форме стержней, напротив, демонстрируют низкий уровень накопления в клетках млекопитающих по сравнению со сферическими частицами Au [72]. Lee и другие [73] обнаружили, что наностержни из Fe_2O_3 более опасны для клеток макрофагов мышей, чем сферические НЧ оксида железа.

Растворимость наночастиц и переход в ионную форму

При попадании в водную среду НЧ могут частично или полностью перейти в ионную форму, в зависимости от их состава [64]. Переход ионов металлов в раствор с поверхности НЧ имеет важное значение в вопросах их токсичности в отношении водных организмов. Перерастворение НЧ и их переход в ионную форму существенно влияют на поведение и токсический эффект НЧ.

Поскольку скорость растворения НЧ зависит от площади их поверхности, то для НЧ предполагают более высокую растворимость в среде по сравнению с крупными частицами такого же состава [74].

Свойства поверхности наночастиц. Влияние стабилизатора

Строение поверхности НЧ оказывает существенное влияние на заряд поверхности, агрегативную устойчивость суспензий, их растворимость в различных средах [75] и напрямую сказывается на токсичности НЧ. Для получения определенных функциональных свойств НЧ и их стабилизации, поверхность НЧ обычно модифицируют различными химическими соединениями [76].

В работе [77] изучено влияние природы стабилизатора на антибактериальную активность НЧ серебра в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli*. Для модифицирования НЧ серебра авторы использовали анионные и катионные ПАВ, а также нейтральные и заряженные полимеры.

Полученные результаты показали, что катионные ПАВ усиливают антибактериальную активность частиц, а биосовместимые неионогенные стабилизаторы не меняют активности серебряных НЧ. Вместе с тем было установлено, что совместное действие стабилизатора и наносеребра приводит к синергетическому увеличению антибактериальной активности. На примере *E. coli* (ATCC 25922) показано [78], что стабилизированные "Мирамистином" наночастицы в 10 раз более эффективны, чем цитратное серебро, и в 20 раз активнее, чем сам "Мирамистин".

Другие физико-химические характеристики и свойства наночастиц

Кроме представленных выше характеристик имеются и другие свойства наночастиц, которые следует рассматривать при работе с наноматериалами, в частности, поверхностный заряд, гидродинамический диаметр, характеристики агрегативной устойчивости, кристалличность и некоторые другие [76].

Элементный состав НЧ играет существенную роль как с точки зрения их поведения в условиях эксперимента, так и их токсичности. Исследования показали, что токсичность различных НЧ сильно варьируется в зависимости от химического состава. Например, по данным [79, 80] НЧ TiO_2 и Au проявляют сравнительно низкую токсичность, тогда как НЧ серебра и меди демонстрируют высокие токсические показатели [81]. Химический состав и чистота НЧ определяют целый ряд физико-химических аспектов, которые могут сказываться на токсических свойствах НЧ, в частности, свойства поверхности (заряд, поверхностная энергия), редокс-потенциал, фотоактивация [53].

Поверхностный заряд связывают с попаданием НЧ в клетки [1]. Как установлено, положительно заряженные НЧ попадают в клетки быстрее отрицательно заряженных, что может быть обусловлено общим отрицательным зарядом клеток. Исходя из этого, есть основания предположить, что положительно заряженные НЧ могут обладать большей опасностью из-за повышенной клеточной проходимостью [82].

Представленные исследования приводят к пониманию того, что физико-химические свойства и характеристики НЧ могут оказывать существенное влияние на механизмы их переноса в живых клетках и их токсичность. Анализ последних исследований и достижений в этой области демонстрирует, что ни одна из характеристик НЧ сама по себе не может служить основным показателем, определяющим их токсичность, хотя некоторые свойства НЧ несомненно играют важную роль в регулировании их биологической трансформации и токсичности.

1.7. Моделирование токсичности наноматериалов

Вполне очевидно, что проведение всестороннего исследования токсичности НЧ с варьированием всех ключевых свойств НМ требует больших материальных затрат и длительно по времени. Экспоненциально растущее количество и разнообразие НМ делает невозможным проводить проверку каждого вновь синтезированного образца НМ, учитывая высокую стоимость исследований и характер тестирования токсичности.

В качестве альтернативы пошаговому экспериментальному исследованию было предложено использование полуэмпирических моделей, которые хорошо зарекомендовали себя для описания свойств классических веществ [83]. Применение моделирования токсичности наночастиц может существенно сократить не только число экспериментальных исследований, но также время и расходы на тестирование.

Такую возможность дает метод количественной зависимости свойства вещества от его структуры (Quantitative structure - activity relationship - QSAR) [84, 85]. Основная цель метода QSAR заключается в установлении математической связи между интересующим свойством вещества и одним или несколькими описательными характеристиками (дескрипторами), определяемыми структурой и составом вещества [86].

Для построения моделей в рамках метода QSAR необходимы следующие составляющие [83]:

1. Информация о строении вещества.

2. Дескрипторы для описания структуры веществ (математическое представление структуры).

3. Математический аппарат для построения моделей (методы машинного обучения).

4. Экспериментальные данные по интересующему свойству веществ.

Для разработки моделей важно иметь информацию по физико-химическим характеристикам и свойствам наночастиц (дескрипторам НЧ) и данные, относящиеся к биологическому эффекту НЧ, включая описание эксперимента и протокол исследования [2]. Также немаловажно знать, что происходит с НЧ в той среде, в которой проводится эксперимент (агломерация, агрегация, переход в ионную форму).

Сначала стоит обсудить второй пункт, поскольку он является ключевым с точки зрения построения моделей. Вполне очевидно, что в случае НЧ описание молекулярной структуры представляет весьма специфическую задачу, так как молекулярная структура нанообъектов, как правило, четко не определена, и применение классических подходов метода QSAR затруднительно. Для таких систем построение моделей следует проводить с применением дополнительной информации, в частности, данных, полученных при исследовании физико-химических свойств НЧ [86].

Чтобы определить, можно ли с помощью указанного метода описать нанообъекты, необходимо обозначить те характерные особенности НМ, которые отличают их от классических веществ и материалов, что позволяет выделить их в особый класс веществ, отличных от других. Если придерживаться классического определения, то к «наносистемам» относят вещества, размер частиц которых лежит в интервале от 1 нм до 100 нм, это условие должно выполняться хотя бы для одного измерения.

Принято считать, что специфика свойств НЧ может быть обусловлена главным образом их малыми размерами и, соответственно, большим отношением площади поверхности к объему, что обеспечивает возможность большего числа контактов на поверхности. Данное обоснование хорошо согласуется с теорией

катализа и находит широкое применение в практике гетерогенного каталитических процессов [87]. Однако эта трактовка не всегда применима для других свойств НМ.

Был проведен ряд исследований, чтобы выявить основные факторы, определяющие специфическое поведение НЧ, и был предложен целый ряд свойств, способных отражаться на поведении НЧ [88]. Учитывая данную специфику, было решено использовать систему физико-химических свойств и характеристик НЧ для описания их строения. Очевидно, что полную комбинацию характеристик НЧ для описания всего спектра их свойств подобрать достаточно сложно. Поэтому правильнее разграничивать модели по категориям. Рекомендуют разграничивать данные по разным классам НМ и рассматривать их по отдельности. В данной работе основное внимание было уделено результатам, полученным для неорганических НЧ, таких как металлы и оксиды металлов.

В последнее время были сделаны попытки построения компьютерных моделей поведения НЧ, включая моделирование токсических свойств. При условии установления надежной взаимосвязи между структурными характеристиками и биологическим эффектом [89, 90], метод QSAR дает возможность заполнения белых пятен при неполных экспериментальных данных или их отсутствии. Были предприняты усилия с целью описания полученных экспериментально данных через физико-химические характеристики НЧ (в частности, клеточное накопление и цитотоксичность) [91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102] и экотоксичности [100, 101, 103, 104, 105, 106, 107].

По данным Таблицы 2 видно, что, несмотря на интенсивные исследования токсичности, метод QSAR применялся для весьма ограниченного числа исследований, причем сравнительно по небольшому числу типов НЧ, и для данных, полученных в близких экспериментальных условиях.

Тем не менее, несколько удачных моделей QSAR было построено с использованием только исходных характеристик НЧ. Так Puzyn [106] при построении модели токсичности 17 НЧ оксидов металлов ограничился одним

дескриптором ΔH_{Me^+} - энтальпией образования газообразного катиона такого же оксидного состояния.

Таблица 2. Обзор Nano-QSAR моделей и данных, используемых для моделирования

Nano-QSAR модели, авторы	Наноматериалы	Свойства	Источник экспериментальных данных
Chao и Yap [108]; Kar [96]; Epa [91]; Fourches [95]; Ghorbanzadeh [94]; Singh и Gupta [109]	146 типов НЧ $(Fe_2O_3)_m/ (Fe_3O_4)_n$ с различными модификаторами поверхности	Клеточное накопление	Weissleder [110]
Singh и Gupta [104] Kar [96]; Puzyn [106], Toropov [107]; Sizochenko [101]	17 типов наночастиц оксидов металлов	Экотоксичность	Puzyn [100], данные частично из [111]
Epa [91]; Fourches [103]; Ehret [92]; Singh и Gupta [104]	48 типов НЧ $(Fe_2O_3)_m(Fe_3O_4)_n$ и два типа квантовых точек	Цитотоксичность	Shaw [112]
Gajewicz [93]; Sizochenko [101]	18 типов наночастиц оксидов металлов	Цитотоксичность	Gajewicz [93]
Pathakoti [105]	17 типов наночастиц оксидов металлов	Экотоксичность	Pathakoti [105]
Liu [97]	9 типов наночастиц оксидов металлов	Цитотоксичность	Liu [97]
Liu [98]	24 типов наночастиц оксидов металлов	Цитотоксичность	Zhang [113]

С использованием этих же данных были построены и другие модели [107, 104, 101], базирующиеся на применении только физико-химических свойств НЧ. Данные примеры свидетельствуют о возможности прогнозирования токсического поведения НЧ на основании их исходных характеристик.

Библиометрический запрос информации в научной базе данных Web of Science по токсичности НЧ, опубликованных за последние годы, содержащих металлы, позволил провести анализ имеющейся информации по токсичности НЧ. Большинство статей включают исследования активности серебряных НЧ по отношению к различным бактериям (Рисунок 1).

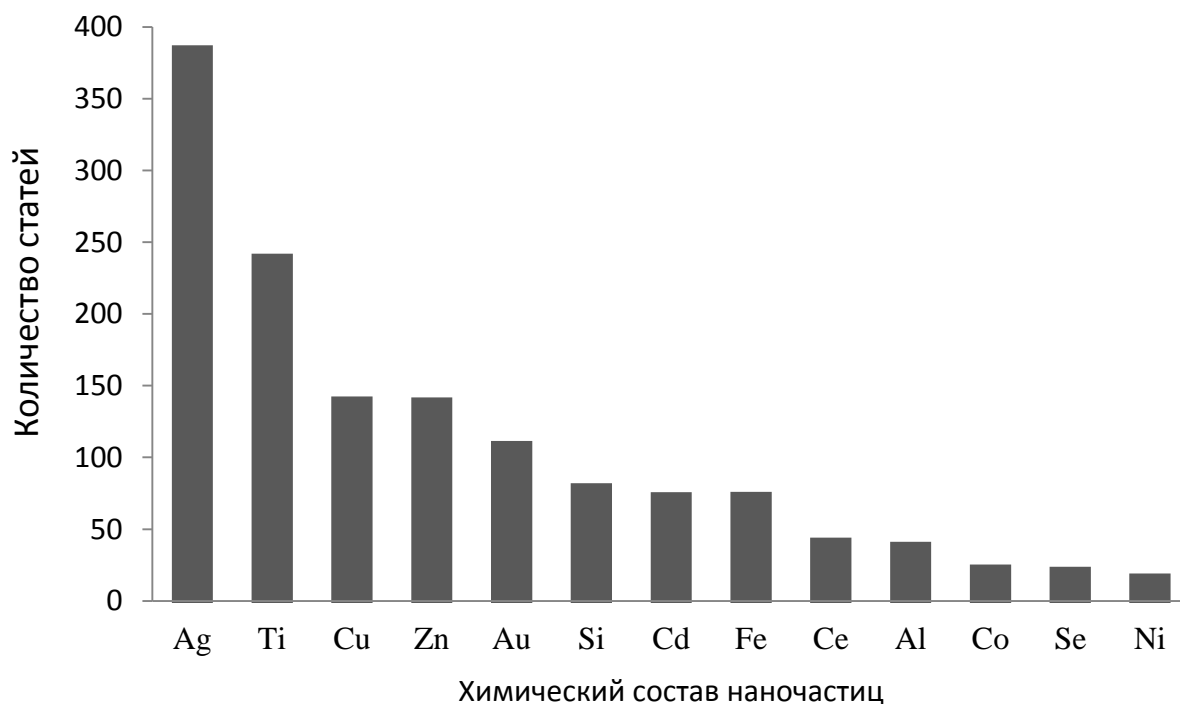


Рисунок 1. Количество научных статей, посвященных изучению токсичных свойств металлических наночастиц.

Общее количество статей, посвященных токсичности НМ, составило 910. Практически в половине статей описаны тесты с бактериями (406 из 910 публикаций), 134 работы выполнены на водорослях, 102 работы проведены с использованием дрожжей, в 17 работах использовали круглых червей, 43 работы выполнены с использованием простейших, в 193 работах использовали ракообразных, и 245 работ посвящены токсичности НЧ в отношении рыб (Рисунок 2).

Анализ работ показывает, что наиболее изученными являются НЧ Ag, в общей сложности 332 работы, в большинстве из которых в качестве тест-объектов используют бактерии и ракообразных. В то же время, большое внимание уделено НЧ TiO_2 (126 работ) и ZnO (109 работ). Что касается исследуемых организмов, то наиболее часто используют бактерии *Daphnia magna*, *E. coli* и водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata*. Эти виды были выбраны для испытаний, соответственно, в 173, 139 и 106 исследованиях по токсичности НЧ. За ними следуют золотистый стафилококк (49 работ), бактерия *Vibrio fischeri* (47 записей) и рыбы *Danio rerio* (44 работы).

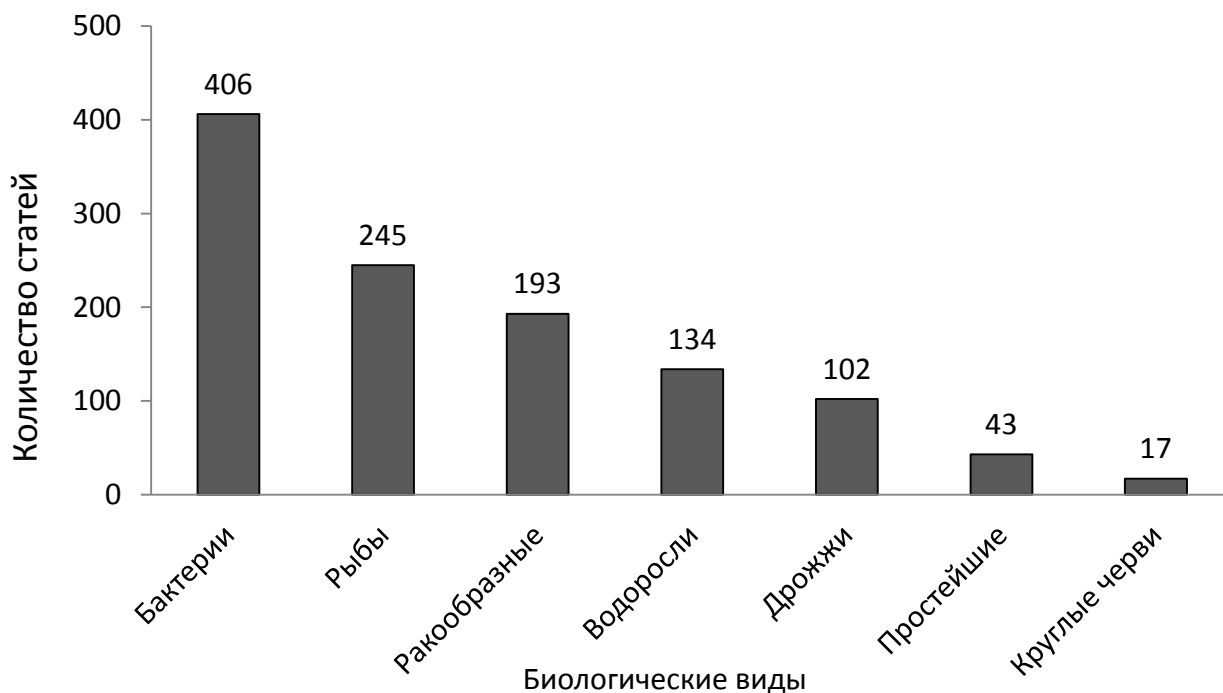


Рисунок 2. Количество научных статей, посвященных изучению токсичности металлических наночастиц в отношении разных биологических видов.

Эти данные могут быть полезными для Nano-QSAR моделирования, но следует обращать внимание на согласованность данных. Весьма показательными являются данные для рачков *Daphnia magna*: 173 найденных записи включают 51 значение LC_{50} , 67 значений EC_{50} , 19 значений NOEC, 13 значений LOEC и 23 других показателя (в частности, LC_{10} , LC_{20} , EC_{10} , EC_{20}). Полученные данные по токсичности для разных объектов объединены в Таблице 3.

В исследуемые биологические эффекты обычно включают следующие показатели: смертность, ингибирование жизнеспособности клеток, ингибирование роста, иммобилизация, ингибирование люминесценции, различные уродства и ингибирование репродукции.

Смертность и торможение роста – это два существенных показателя, которые, как правило, применяются при анализе экотоксичности. Такой эффект как мобилизация является важным фактором, который часто используется для определения токсичности НЧ в отношении ракообразных. В то же время, эффект ингибирования люминесценции рассматривается только при использовании бактерий.

Таблица 3. Биологический эффект наночастиц в отношении разных биологических объектов (в скобках указано число записей)

	Водоросли	Бактерии	Ракообразные	Рыбы	Круглые черви	Простейшие	Дрожжи	
Смертность	LC ₅₀ (1)	LC ₅₀ (23)	LC ₅ (1)					
		MBC (49)	LC ₁₀ (3)	LC ₅₀ (44)	LC ₅₀ (7)	LC ₅₀ (8)		
			LC ₁₅ (1)	LD ₅₀ (2)				
			LC ₂₀ (6)	LOEC (4)				
			LC ₂₅ (1)					
			LC ₅₀ (82)					
			LOEC (10)					
		NOEC (16)						
Ингибирование клеточной жизнедеятельности	EC ₅₀ (2)	EC ₅₀ (4)				EC ₅₀ (4)	EC ₅₀ (10)	
Ингибирование роста	EC ₁₀ (21)	EC ₅₀ (13)	EC ₅₀ (1)	EC ₅₀ (2)	EC ₅₀ (14)	EC ₅₀ (7)	EC ₂₀ (5)	
	EC ₂₀ (19)	MIC (110)					EC ₅₀ (12)	
	EC ₃₀ (2)	LOEC (15)						
	EC ₅₀ (91)	NOEC (6)						
	EC ₁₀₀ (2)							
	LOEC (6)							
NOEC (15)								
Иммобилизация			EC ₁₀ (10)					
			EC ₅₀ (59)		EC ₅₀ (3)			
			NOEC (3)					
Ингибирование люминесценции		EC ₁₀ (2)						
		EC ₂₀ (15)						
		EC ₅₀ (86)						
		MIC (2)						
		LOEC (2)						
NOEC (2)								
Пороки развития				EC ₅₀ (10)				
Ингибирование размножения	EC ₅₀ (2)		EC ₁₀ (5)		EC ₅₀ (2)			
			EC ₂₀ (4)					
			EC ₅₀ (13)					
			LOEC (4)					
			NOEC (4)					
Другие		EC ₅₀ (9)	EC ₅₀ (2)	EC ₅₀ (4)				
		NOEC (2)	LOEC (1)	NOEC (1)				

Анализ многочисленных данных по токсичности НЧ, содержащих различные металлы, был выполнен по шести видам, упомянутым выше. Кроме того, средние значения L(E)C₅₀ для этих НЧ были проанализированы для выбранных организмов (Таблица 4).

Таблица 4. Средние значения полулетальной/полуэффективной концентрации (LC_{50}/EC_{50}) для разных организмов, мг/л (в скобках указано число записей)

	Водоросли	Бактерии	Ракообразные	Рыбы	Круглые черви	Простейшие	Дрожжи
Ag	0,10 (25)	19,25 (20)	0,01 (57)	1,36 (33)	2,85 (19)	38,00 (5)	
Al	20,86 (3)	172,83 (1)	45,79 (7)		43,25 (1)		
Au	38,00 (5)	0,32 (6)					38,00(1)
Ce	7,07 (18)	28,96 (12)	29,89 (7)				
Co		33,08 (2)	1,67 (1)				
Cu	2,80 (4)	17,36 (20)	0,61 (22)	0,83 (4)		127,00 (3)	4,38 (13)
Fe		309,81 (2)	36,00 (3)	37,35 (3)		0,57 (1)	
La		388,37 (1)					
Ni	25,50 (3)	111,43 (2)	2,28 (2)				
Sb		344,57 (2)					
Se				1,00 (1)			
Si				112,80 (1)		208,02 (1)	
Sn		826,02 (1)					
Ti	18,96 (27)	111,00 (16)	3,90 (31)	93,00 (13)	47,94 (1)		
Zn	1,94 (2)	24,80 (27)	1,20 (15)	1,54 (4)	635,00 (5)	5,00 (3)	100,80 (2)

Главная цель данного анализа состояла в том, чтобы идентифицировать наиболее опасные НЧ и сосредоточить внимание на их моделировании. Придерживаясь директивы ЕС 93/67/ЕЕС [114], и с учетом исследований [115], НЧ могут быть классифицированы на пять классов опасности. На основании данных градаций, НЧ Ag и Cu относятся к категории "Очень токсичные" для водных организмов.

Данные также сравнивали по токсичности в отношении конкретных НЧ или организмов с целью выявления наиболее токсичных НЧ для каждого организма или выявления организма, наиболее чувствительного для выбранных НЧ. В частности, НЧ Ag имеют самый низкий средний показатель $L(E)C_{50}$ (наиболее токсичные) для водорослей (0,1 мг металла/л), ракообразных (0,01 мг металла/л) и нематод (2,85 мг металла/л). Ракообразные, водоросли и рыбы являются наиболее чувствительными к Ag (0,01; 0,10 и 1,36¹ мг металла/л, соответственно).

Вместе с тем проводился анализ того, насколько хорошо в статьях по токсичности представлены характеристики НЧ и их физико-химические свойства в виде измеренных и вычисленных свойств. На Рисунке 3 показано распределение

¹ Усредненные значения по всем экспериментальным данным

частоты упоминания конкретного свойства НЧ в научных работах. Свойства включали: ζ -потенциал, поверхностный заряд, площадь поверхности, размер, форму, чистоту, степень кристалличности и наличие стабилизатора.

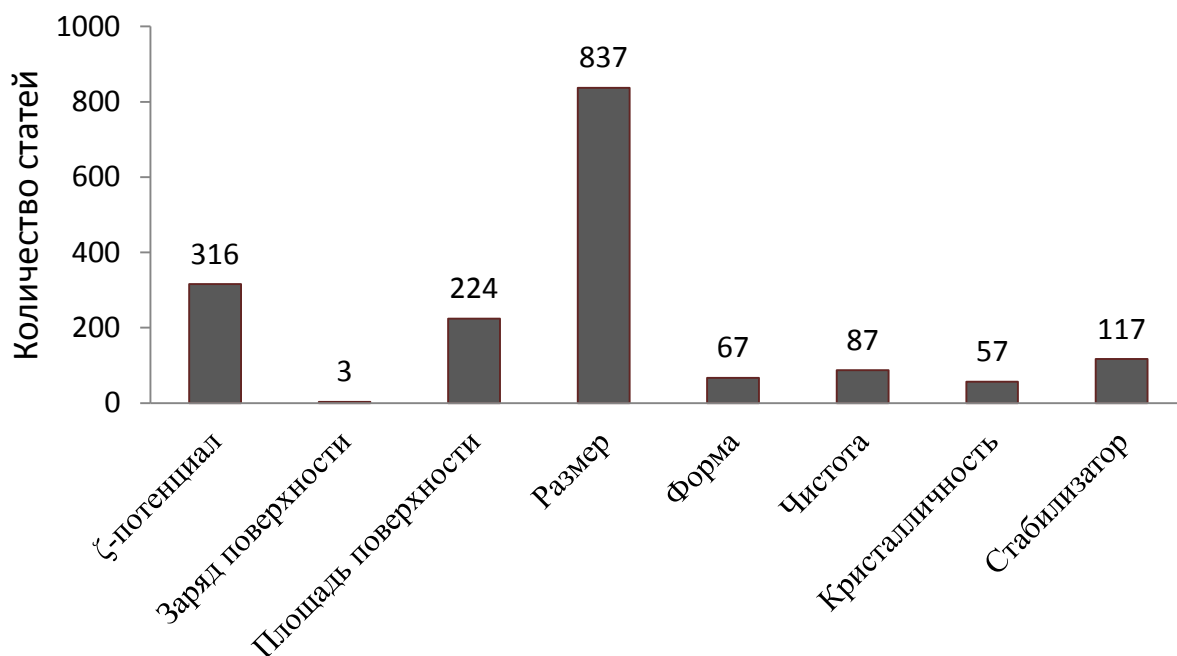


Рисунок 3. Количество статей, приведенных в научных статьях, посвященных изучению физико-химических и иных характеристик и токсичности металлических наночастиц.

Результаты показывают, что исходный размер НЧ – это, как правило, наиболее часто используемый параметр наночастиц (837 упоминания), за ним следует ζ -потенциал (316 упоминаний), площадь поверхности (224 упоминания), стабилизатор (117 упоминаний) и чистота (87 упоминаний). Лишь в ограниченном числе исследований представлена информация о форме НЧ (67 упоминаний), кристалличности (57 упоминаний) и поверхностном заряде (3 упоминания). Число характеристик, приведенных в среднем на статью, показано на Рисунке 4.

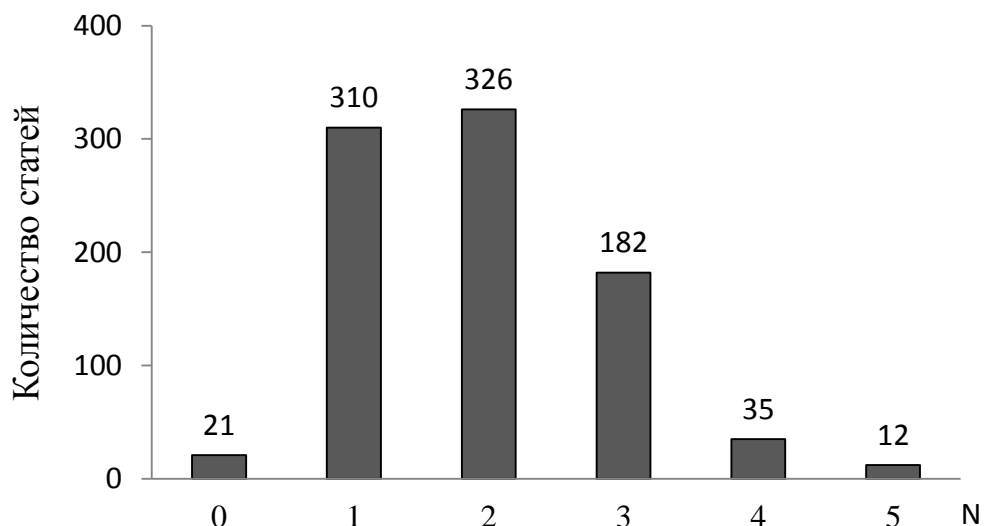


Рисунок 4. Распределение статей, посвященных токсичности наночастиц, в зависимости от количества рассматриваемых в них физико-химических свойств наночастиц: N – количество физико-химических или физических величин, обсуждаемых в статьях.

Количество данных о физико-химических свойствах НЧ в статьях ограничено. Большинство опубликованных работ, посвященных токсичности НЧ, содержат один или два свойства НЧ, и только 5,3% из собранных записей содержат более трех характеристик НЧ.

Поскольку количество типов и разнообразие НЧ, можно ожидать, будет быстро расти, развитие надежных моделей, которые позволят прогнозировать их потенциальную токсичность имеет важное значение для оценки риска производства и применения НЧ. QSAR-подход считается одним из возможных способов достижения данной цели.

Моделирование токсических эффектов НЧ различного состава может помочь сократить время экспериментальных исследований, сократить общие расходы и сохранить жизнь организмов, используемых в «in-vivo» тестированиях.

Из приведенных литературных данных можно заключить, что исследование токсического действия НЧ серебра на водные организмы имеет большое значение, тем более, что НЧ серебра получили широкое практическое применение и распространение в промышленности. Однако, несмотря на большое количество работ по исследованию токсичности НЧ серебра, в этой области остается

достаточно много спорных и сложных вопросов. Среди них такие, как поведение НЧ серебра в экспериментальных средах; вопросы о том, сохраняют ли НЧ серебра свои свойства при попадании в различные среды, какие характеристики этих НЧ определяют их токсикологические свойства и другие. Безусловно, определение физико-химических характеристик и свойств НЧ серебра в экспериментальных средах должно расширить понимание о механизме токсичности этих НЧ. Вместе с тем, накопление знаний и анализ информации о НЧ серебра может служить той экспериментальной базой, которая позволяет выявить взаимосвязь между физико-химическими свойствами и характеристиками НЧ серебра и их токсичностью.

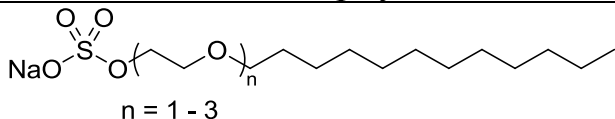
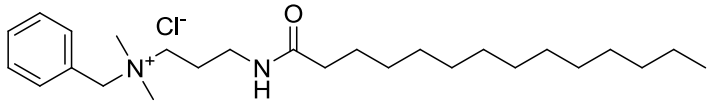
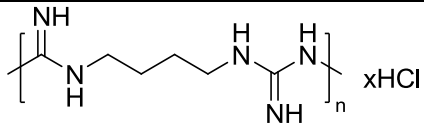
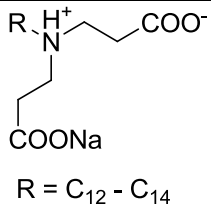
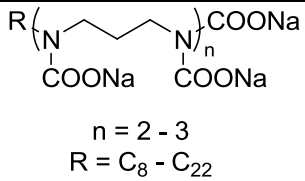
Вполне очевидно, что объединение накопленного опыта научных исследований в области токсикологии НМ имеет большое значение для разработки инструментов анализа оценки опасности НЧ и развития исследований по токсичности НМ. В вопросах токсичности НЧ определение взаимосвязи между физико-химическими свойствами и токсичностью НЧ для биологических систем представляет обязательное условие при разработке безопасных и эффективных продуктов. Поэтому основной задачей представленной работы являлось установление факторов, которые способны оказывать влияние на токсичность НЧ серебра и выявление совокупности физико-химических характеристик и свойств НЧ позволяющих проводить компьютерное моделирование их токсичности.

2. Экспериментальная часть

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования в работе были коммерческие образцы НЧ серебра и синтетические водные суспензии НЧ серебра различной формы и размера (Таблица 5).

Таблица 5. Стабилизаторы, использованные при синтезе суспензий наночастиц серебра

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

Все соединения можно разбить на две группы: сферические НЧ с различными ПАВ и несферические НЧ разной формы, полученные при разном времени нагрева (Ag_1.i) и с разными концентрациями восстановителя (Ag_2.i).

Выбор разнообразных стабилизаторов обусловлен необходимостью стабилизации НЧ, модифицированных веществами различной природы, при использовании которых, с одной стороны, могут иметь место различные механизмы стабилизации, а с другой стороны появляется возможность варьирования размера и заряда получаемых НЧ, а также контроля уровня их экологической безопасности. Из литературных данных [116, 117, 118] известно, что некоторые ПАВ и полимеры могут эффективно стабилизировать НЧ серебра.

Частицы, стабилизированные соединениями различной природы, были предоставлены лабораторией Химии поверхности Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

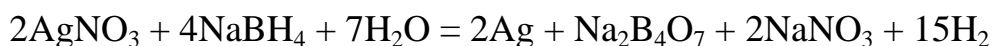
2.2. Реагенты и материалы

В работе были использованы следующие химические вещества и реактивы: нитрат серебра (Реахим, 99%), перхлорат серебра (Sigma-Aldrich, 99+%), борогидрид натрия (Lancaster, 98%), цитрат натрия дигидрат (Sigma-Aldrich, осч.), формиат натрия (Реахим, осч.), полифосфат натрия (MW = 2100, Fluka, осч.), пероксид водорода 10%-ный раствор (Химмед, х.ч.), натриевая соль сульфэтоксилата додеканола (70% раствор в воде, Hansa), диоктилсульфосукцинат натрия (Sigma-Aldrich, 99%), хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммония (99%, Украина), талловый амфополикарбоксихлицинат натрия (30% раствор в воде, до 10% NaCl, Akzo Nobel), кокодипропионат натрия (99%, Lakeland), полигексаметиленбигуанид гидрохлорид (20% водный раствор, Arch), поливинилпирролидон (PVP, K90, Sigma-Aldrich) и Agbion (водный раствор, Наноиндустрия). Для приготовления рабочих растворов во всех экспериментах использовали дистиллированную воду.

2.3. Методики получения водных суспензий наночастиц серебра

Для синтеза НЧ серебра в водной среде был использован метод восстановления нитрата серебра борогидридом натрия в присутствии стабилизатора. Благодаря высокой реакционной способности борогидрида натрия

(по сравнению с цитратом, углеводами и полифенолами), удобством в использовании (преимущество по сравнению с газообразным водородом и физическими методами) и невысокой токсичности (по сравнению с гидразином и гидроксиламином), метод восстановления ионного серебра борогидридом натрия является наиболее удобным в процессах синтеза НЧ серебра. Метод отличается простотой и хорошей воспроизводимостью результатов [119]. При этом происходит восстановление серебра по реакции:



Методика получения плоских НЧ серебра (треугольные и усеченные треугольные призмы), стабилизированных цитрат-анионом и поливинилпирролидоном (PVP)

Синтез НЧ серебра проводили по методу Миркина [120] с варьированием температурного режима и концентрации восстановителя.

Различное время нагрева

В водный раствор AgClO_4 (60 мл, 1 мМ), цитрата натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (108 мл, 0,1 мМ), поливинилпирролидона (42 мл PVP; 0,1 мМ в расчете на мономер) и H_2O_2 (1,44 мл, 30% по массе) добавляли NaBH_4 (48 мл, 0,1 мМ). Наблюдали изменение цвета раствора от бледно-желтого до голубого цвета в течение получаса. Полученный раствор (образец Ag_1.1) разделяли на три части по 200 мл. Образцы Ag_1.2 и Ag_1.3 были получены из раствора Ag_1.1 после выдерживания последнего при 95°C в течение 3,5 и 10 минут, соответственно.

Различные концентрации восстановителя

При тщательном перемешивании в реакционную смесь, содержащую AgNO_3 (0,1 мМ), цитрат натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (1,8 мМ), поливинилпирролидон (PVP; 0,7 мМ) и H_2O_2 (20 мМ), добавляли различные концентрации восстановителя NaBH_4 (0,4; 0,6; 0,7 и 0,8 мМ). Получены образцы Ag_2.1; Ag_2.2; Ag_2.3 и Ag_2.4, соответственно.

Сферические НЧ серебра

Сферические НЧ, стабилизированные смесью цитрата натрия (Cit) и поливинилпирролидоном (PVP) были получены методом химического восстановления (Ag_3.1). Химическое восстановление проводили по той же схеме, что и для пластин серебра, но без добавления пероксида водорода и последующего нагревания. Наночастицы с наименьшим размером получались при восстановлении Ag^+ под действием γ -излучения в водном растворе (Ag_3.2) по методике [121]. Облучение проводили источником ^{60}Co . Раствор, содержащий $1 \cdot 10^{-4}$ М AgClO_4 , $1 \cdot 10^{-3}$ М HCOONa и $5 \cdot 10^{-4}$ М полифосфата натрия, предварительно вакуумировали в специальных стеклянных сосудах перед облучением.

Наночастицы композита серебра

Дополнительно исследовали высокостабильные суспензий НЧ композита переменного состава Ag_xAgCl (где $x < 1$), стабилизированного амфотерным ПАВ [122], предоставленные лабораторией Химии поверхности, Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.4. Физико-химические методы исследования наночастиц

Электронная (УФ) спектроскопия

Для регистрации УФ-спектров поглощения суспензий использовали спектрофотометр Varian Cary 100 с регулируемой температурой кюветного отделения и кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Динамическое светорассеяние (DLS)

Размеры наночастиц, их распределение по размерам и ζ -потенциал определяли методом динамического рассеяния света. Исследования проводили на приборе Delsa TM Nano C (Beckman Coulter, США) при длине волны 658 нм. Полученные значения размеров частиц являлись результатом усреднения не менее 70 измерений. Сами измерения проводили в кварцевой кювете. Перед

началом измерений исследуемые растворы термостатировали при температуре 20°C. Измерение ζ -потенциалов проводили путем наложения электрического поля на кювету с суспензией наночастиц серебра с использованием методики, основанной на лазерной доплеровской анемометрии.

Анализ траектории наночастиц (NTA)

Измерения размера частиц в растворе методом анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) проводили на приборе Nanosight LM10 (Nanosight Ltd, Великобритания) в конфигурации HS-BF, содержащей лазерный источник с длиной волны 405 нм и мощностью 65 мВт, высокочувствительную камеру Andor Luca типа EMCCD. Измерения проводили в соответствии со стандартом ASTM E2834 [123]. Исходные образцы разводили в необходимое число раз для достижения оптимальной для метода концентрации частиц и измеряли в нескольких повторах с суммарной статистикой не менее 1500 частиц.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)²

Микрофотографии НЧ серебра получали на просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB Omega (Leo Ltd., Германия) с рабочим ускоряющим напряжением 100 кВ. Образцы готовили нанесением 1-2 мкл золя на покрытую формваром медную сетку ($d = 3,05$ мм), которую затем сушили на воздухе в течение 5-10 мин.

Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС)

Содержание металлов в тканях проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе Perkin-Elmer (с использованием приставки AA 240-FS, AA 240Z gta120). Пробы тканей для исследования готовили методом мокрого озоления.

² Автор выражает благодарность сотрудникам МГУ имени Ломоносова: Абрамчуку Сергею Савельевичу за получение микрофотографий ПЭМ и Евтушенко Евгению Геннадиевичу за данные по характеристике НЧ методом NTA

Для всех исследуемых растворов были получены распределения по размерам частиц, определены ζ -потенциалы; сделаны микрофотографии на просвечивающем электронном микроскопе, получены спектры светопоглощения и микродифрактограммы.

2.5. Экспериментальные методы оценки токсичности наночастиц с использованием гидробионтов

Общеизвестно, что водные объекты являются первичной мишенью для различных видов загрязнений, в том числе и НЧ. При попадании в стоячие водоемы НЧ могут со временем накапливаться, что может привести к значительным локальным концентрациям.

В рамках работы были проведены эксперименты по определению влияния НЧ серебра на развитие и жизнедеятельность различных гидробионтов. В качестве тест-объектов были подобраны такие виды гидробионтов, которые широко используются в международной практике по токсикологии, а также наиболее часто встречаются в водоемах средней полосы России. Для типовых обитателей водоемов России были разработаны и адаптированы оригинальные методики оценки токсичности НЧ.

Объектами для биологических исследований служили водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, двухстворчатые моллюски *Unio tumidus*, плоские черви - планарии *Jirardia tigrina*, пресноводные рачки *Daphnia magna*, развивающаяся икра рыб *Danio rerio*. Основными критериями токсичности НЧ служили: для *U. tumidus* и *Danio rerio* полумлетальная концентрация, снижение двигательной функции у рачков *Daphnia magna*, подавление роста водорослей *C. vulgaris* Beijer, замедление регенерации планарий *J. tigrina*, изменение сердечных ритмов и накопление серебра в тканях моллюсков *U. tumidus*. Ниже рассмотрены основные характеристики выбранных гидробионтов и специфические особенности проводимых с ними исследований.

2.5.1 Тест-объект — водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer

Водоросли находятся в основе водных экосистем и могут быть использованы в качестве биоиндикаторов водных сред [124]. Преимущества использования водных растений связаны с их высокой скоростью роста. Данная особенность позволяет быстро получать большое количество биологического материала и даёт возможность за короткие сроки проследить действие токсикантов на основные фазы роста водорослей.

В работе проводили анализ скорости роста культуры клеток *C. vulgaris* Beijer при интенсивном культивировании. Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли *C. vulgaris* Beijer, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контрольный опыт), и тестируемых пробах.

Согласно стандартизованной методике [125], критерием токсичности считали подавление роста на 20% и более или увеличение стимуляция роста более чем на 30% по данным величины оптической плотности культуры водоросли в течение 22 часов. Биотестирование проводили в лабораторных условиях при температуре воздуха от +17 до +27°C. Атмосферное давление 84-106 кПа (630-800 мм рт. ст.).

2.5.2 Тест-объект — двусторчатые моллюски *Unio tumidus*

В водных экосистемах одной из основных мишеней для экотоксикантов являются фильтрующие моллюски. Эти организмы поглощают фитопланктон и зоопланктон, являющиеся первичным звеном в накоплении и трансформации загрязняющих веществ. Дополнительно они испытывают прямое воздействие загрязненной воды, так как все время прокачивают её через свой организм.

Согласно разработанной методике проводили анализ гибели моллюсков при содержании в среде НЧ. Методика основана на регистрации различий сердечных ритмов и дыхательной активности объектов.

Для экспериментов использовали наиболее распространенный вид фильтрующих моллюсков *Unio tumidus*³. Отбор объектов вели таким образом, чтобы обеспечить максимально близкие фильтрационные способности тестируемых животных.

Экспериментальные группы моллюсков содержали в цилиндрических пластиковых сосудах с заданными концентрациями тестируемых веществ и измеряли время, за которое погибала половина моллюсков. Время наблюдений составляло 7 суток. Воду перемешивали с помощью регулируемого мининасоса *TUNZE Mini*. Температуру воды поддерживали на уровне 20°C. Во время эксперимента животных не кормили. Освещения в рамках эксперимента поддерживали в режиме день / ночь — 12/12 часов. Забой животных с целью проведения химического анализа тканей производили сразу после окончания эксперимента.

2.5.3 Тест-объект — плоские черви планарии *Jirardia tigrina*

Пресноводные плоские черви – планарии представляют собой весьма распространенную группу беспозвоночных животных, и являются перспективным объектом по исследованию токсичности новых материалов. Планарии принято считать биологическим индикатором чистоты пресной воды.

Как биологический объект планарии обладают двумя важными особенностями. Во-первых, у планарий имеется централизованная нервная система, так называемый головной ганглий, а во-вторых, они обладают уникальной способностью к репаративной регенерации [126].

В опытах с регенерацией планарий после операции животное помещали в исследуемый раствор. В ходе эксперимента анализировали величину отрастания бластемы (критерий регенерации) на третий день после перерезки с помощью метода прижизненной компьютерной морфометрии. Работу проводили на

³ Автор выражает благодарность Машкину П.В. за помощь в проведение экспериментов по токсичности наночастиц в отношении моллюсков

уникальной лабораторной культуре пресноводных плоских червей - планарий *J. tigrina*.

Для получения изображений регенерирующих планарий был использован компьютерный микроскоп *Stemi 2000* с цифровой видеокамерой *AxioCam (Carl Zeiss)*. С помощью специального пакета программ *Plana 4.4* определяли общую площадь тела животного и площадь отрастающей части (бластемы). В качестве количественного критерия роста использовали критерий отрастания (регенерации) - $R=s/S$, где s - площадь бластемы, S - площадь всего тела планарии на третий день регенерации.

2.5.4 Тест-объект — пресноводные рачки *Daphnia magna*

Зоогидробионт *Daphnia magna* считается одними из наиболее чувствительных тест-объектов в отношении многих экотоксикантов [127].

Они интенсивно используются в экотоксикологии, благодаря своему малому размеру, короткому жизненному циклу и легкости лабораторного разведения. Биотестирование проводили на синхронизированной культуре *Daphnia magna*. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путём ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна, а составляющие её особи обладают близкими уровнями устойчивости к токсическим веществам [128].

Вид *Daphnia magna* использовали для оценки экотоксичности НЧ, согласно протоколу OECD №202 [129]. Тест-организмы подвергали воздействию различных концентраций НЧ в интервале, охватывающем предполагаемые значения EC_{50} и EC_{10} ⁴, где максимальная концентрация отвечает 100% эффекту иммобилизации, а минимальная не оказывает существенного влияния.

По результатам тестирования определяли значение EC_{50} . Вывод о степени токсичности вещества делали на основании зависимости гибели *Daphnia magna* от концентрации НЧ.

⁴ EC_{50} и EC_{10} концентрация понижающая свойства на 50% и 10% соответственно.

2.5.5 Тест–объект — рыбы *Danio rerio*

Для определения эмбриотоксичности НЧ анализировали уровень смертности в течение 96 часов и показатели развития для выживших эмбрионов рыб. В качестве основного объекта для исследований были выбраны пресноводные рыбы *Danio rerio* на эмбриональной стадии развития (*Danio rerio*, Hamilton, 1822).

Данный вид включен в список рекомендуемых объектов для исследования экотоксичности веществ и препаратов, в том числе и последних разработок, включающих НЧ как основное вещество или сопутствующий компонент [130].

Для *Danio rerio* можно выделить ряд преимуществ с точки зрения постановки эксперимента: получение большого количества анализируемых показателей за достаточно короткий промежуток времени (цикл развития икры составляет 96 часов), четкость фиксирования показателей смертности и морфогенеза эмбрионов.

Эксперимент проводили согласно сертифицированному протоколу [130] с небольшой модификацией, с целью получения статистически надежных результатов: на стадии определения рабочего интервала концентраций количество эмбрионов было увеличено с 10 до 24. Эксперимент включал в себя две основные стадии: определение рабочего интервала и оценка полулетальной концентрации (LC_{50}). Значению LC_{50} отвечает количество вещества в единицах концентрации, приводящее к 50% гибели в популяции. На первой стадии работали в широком интервале концентраций, чтобы определить концевые значения рабочей области. Далее проводили эксперимент в узком диапазоне концентраций, и определяли значение полулетальной концентрации. Для каждой концентрации проводили по два-три измерения.

Икру собирали сразу после оплодотворения на стадии морулы и инкубировали в среде E3 [131] (ммоль): NaCl – 5; KCl – 0,17; CaCl₂ – 0,33; MgSO₄ – 0,33; pH 7,2–7,3. Каждую икринку помещали в отдельную лунку в 24-луночные планшеты. Планшеты с икрой содержали при естественном освещении и температуре 26°C. Каждые 24 ч подсчитывали число погибших эмбрионов,

эмбрионов с нарушением в развитии и число вылупившихся личинок. Учитывали такие нарушения, как отек перикарда, сколиоз и уменьшение размеров тела. Тест проводили в течение 96 ч. Стадии развития икры контролировали под биноклем (*Karl Zeiss, Stemi 2000C*). Статистическую обработку результатов проводили в программе *Graph Pad Prism 5.0*.

2.6. Моделирование токсичности наночастиц

Для моделирования токсического действия НЧ использовали экспериментальные данные, опубликованные в научной литературе. Литературные данные были проанализированы и занесены в базу данных ОСНЕМ. При работе с литературными источниками внимание было обращено на данные по токсичности НЧ металлов и оксидов металлов (Fe, Ag, Pd, Ni, TiO₂, ZnO, CuO и другие).

База данных. Накопление данных по токсичности НЧ

В основу базы данных для хранения и обработки данных по токсичности наночастиц была взята онлайн база данных <https://OSNEM.eu/>. Это химическая база данных на основе web-платформы дает возможность наполнения, редактирования и хранения данных, а также эта база данных включает специальный математический аппарат для построения моделей и интерпретации данных [132].

При заполнении базы данных необходимо ввести четыре обязательных параметра, которые должны быть описаны соответствующим образом: свойство, численное значение свойства, источник информации и описание вещества. При наполнении оператор базы данных должен ответить на следующие вопросы: Какое свойство исследуется? Какое значение отвечает заданному свойству? Откуда взята информация? Для какого вещества получены данные?

Под термином свойство подразумевается интересующая исследователя характеристика вещества, в частности, температура плавления, минимальная ингибирующая концентрация и т.д. Для каждого свойства задаются единица

измерения и правила пересчета из других единиц, при необходимости вводят так называемые обязательные параметры, в частности, условия проведения эксперимента.

В качестве обязательных параметров мы использовали основные физико-химические характеристики НЧ, а также их средний размер и форму. В основу были взяты следующие свойства НЧ: химический состав, ζ -потенциал и удельная площадь поверхности, гидродинамический диаметр НЧ, тип стабилизатора.

Свойство вещества можно задать качественным или количественным описанием. Величина может задаваться дискретным значением, интервалом, больше или меньше указанных величин. Также необходимо указать источник информации с указанием автора, издательства и наименования, что позволяет сверить данные, если имеются расхождения при построении модели.

Основные показатели токсичности НЧ, выбранные для моделирования, представлены в Таблице 6.

Собранные данные охватывают различные показатели токсичности, разные условия экспериментов, разные биологические объекты, а также химический состав тестируемых соединений. Данные для концентрации, в частности, для полулетальной и эффективной концентраций, приведены в логарифмическом формате ($\text{Log}(\text{LC}_{50})$ и $\text{Log}(\text{EC}_{50})$).

Таблица 6. Показатели токсичности НЧ, выбранные для моделирования

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

Обработка и подготовка данных

С целью построения моделей, внесенные данные по токсичности НЧ были разбиты на несколько отдельных блоков данных.

Блок данных №1 по показателям LC_{50} включил в себя 335 типа НЧ, для которых значения LC_{50} варьировались от 0,001 до 20000 мг/л. Все НЧ были условно разделены на две группы: высокотоксичные (154 типа НЧ с показателями $LC_{50} \leq 2,0$ мг/л) и низкотоксичные НЧ (122 типа НЧ с показателями $LC_{50} > 2,0$ мг/л). Остальные 59 типов НЧ были исключены из набора как дубликаты, поскольку они имеют тот же состав и набор обязательных условий, что и НЧ в исходном блоке данных. Блок №1 был разделен на две выборки, отличающихся химическим составом НЧ: выборка 1.1 - с данными по 101 типу НЧ, представляющих собой оксиды металлов, и выборка 1.2 - с 234 показателями для металлических НЧ.

Блок данных №2 по значениям EC_{50} состоял из данных для 221 типа НЧ, показатели EC_{50} находились в интервале от 0,001 до 20000 мг/л. По аналогии с предыдущим, данные были разделены на низко- (111 типа НЧ со значениями $EC_{50} > 2,0$ мг/л) и высокотоксичные (92 типа НЧ со значениями с $EC_{50} \leq 2,0$ мг/л). Оставшиеся 18 дубликатов были исключены из рассмотрения с точки зрения принятой классификации.

Данные по MIC мы объединили в **блок данных №3**, состоящий из 94 типов НЧ со значениями MIC от 0,84 до 20000 мг/л. Высокотоксичные НЧ составили 48 типов ($MIC \leq 4,0$ мг/л), а низкотоксичные – 46 типов ($MIC > 4,0$ мг/л).

Блок данных №4 состоял из 23 типов НЧ со значениями LD_{50} от 3 до 1105 мг/л, из которых высокотоксичных было 9 типов ($LD_{50} \leq 100,0$ мг/л) и 14 типов НЧ с низкой токсичностью ($LD_{50} > 100,0$ мг/л).

Блок данных №5 включал 75 типа серебряных НЧ со значениями LC_{50} для различных водных организмов.

Дескрипторы для описания структуры веществ

Для описания химического вещества существуют несколько вариантов: графическое построение формулы, описание через SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) или по наименованию.

В случае НЧ такое описание веществ осложнено отсутствием единой системы классификации и наименования НЧ. Для описания показателей токсичности НЧ в список обязательных условий эксперимента были включены характеристики НЧ, которые в дальнейшем были использованы для построения моделей. К числу таких показателей относили размер и форму НЧ, химический состав НЧ и тип поверхностного модификатора (стабилизатора). Таким образом, наряду с условиями проведения эксперимента имелась информация об основных физико-химических характеристиках и свойствах НЧ, использующих при моделировании.

При предварительной обработке данных все структуры были оптимизированы и стандартизованы с применением программ ChemAxon Standardizer [133] и Corina [134]. Дескрипторы, доступные в базе данных OCHEM, сгруппированы по названиям задействованного программного обеспечения, в частности, E-State индексы [135], ALogPS программа [136], Dragon дескрипторы [137].

E-State индексы основываются на теории графов. E-state индексы представляют 2D дескрипторы, которые объединяют электронные характеристики с топологическими параметрами окружения для каждого атома.

ALogPS работает с двумя 2D дескрипторами, а именно растворимостью в воде и коэффициентом распределения октанол/вода.

Chemaxon descriptors. Плагин ChemAxon Calculator [133] предоставляет доступ к множеству дескрипторов. При этом в качестве дескрипторов были использованы только свойства, которые закодированы с помощью численных или логических значений. Они разбиваются на семь групп, от 0D до 3D, в зависимости от элементного анализа, заряда, геометрии и другие.

Программа Dragon V.6.0 [138] способна обрабатывать до 4885 молекулярных дескрипторов, подразделяемых на 29 различных логических категорий.

Методы машинного обучения. Математический аппарат для построения моделей

Для построения высокоточных моделей прогнозирования токсичности НЧ были использованы несколько методов машинного обучения. Для построения QSAR моделей были задействованы методы машинного обучения с использованием основных характеристик НЧ и их физико-химических свойств и различных совокупностей дескрипторов.

Метод ассоциативных «нейронных сетей» (Associative Neural Network - ASNN). Данный метод сочетает в себе группу «нейронных сетей» с прямой связью. Обучение осуществляется с помощью алгоритма обратного воспроизведения (Back-Propagation Neural Network BPNN) и с применением метода k-ближайших соседей (k-nearest neighbors kNN) [139]. Последний был использован для исправления предсказанных значений, усредненных по группе «нейронных сетей», которые основаны на предсказании «ближайших k значений» в химическом окружении или в среде группы моделей BPNN. Данный процесс коррекции предсказанных значений, основанный на наборе ближайших значений, предназначен для уменьшения систематической ошибки в подмножестве химического пространства и известен как метод Локальной Коррекции или метод Ассоциативной памяти [139]. Ассоциативные «нейронные сети» используют корреляцию между наборами результатов в качестве меры интервалов среди анализируемых задач для метода ближайших соседних значений. Метод ASNN значительно повышает точность прогноза для моделей и не требует переобучения «нейронной сети» [140].

Метод ближайших k соседей. Данный метод предсказывает активность или класс выбранного объекта (вещества) путем поиска наиболее распространенного среди ближайших к образцу k соседних значений. Значение k является целым положительным числом, которое выбирается путем перекрестной проверки. При $k = 1$ объекту присваивается класс самого близкого из его соседей [141]. В случае регрессионного анализа, среднее значение активности ближайших k соседей используется в качестве прогнозируемого результата. Соседние значения брали из обучающей выборки веществ, для которых известна правильная классификация (или, в случае регрессии, значение моделируемого свойства). Для того, чтобы идентифицировать соседей, объекты представляли векторами положения в многомерном пространстве. Следует отметить, что алгоритм ближайшего k соседа чувствителен к локальной структуре данных. Оптимальное значение k в диапазоне от 1 до 100 определяли автоматически в программе OCHEM.

Метод WEKA-RF (алгоритм «случайного леса» в программной среде Waikato Environment for Knowledge Analysis). Этот метод также является реализацией метода WEKA случайного дерева решений [142]. Лежащий в его основе алгоритм имеет ряд привлекательных особенностей, в частности, наличие внутренней процедуры выбора дескрипторов. Дерево решений (ДР) не зависит от взаимосвязанных дескрипторов, поскольку оно использует случайные выборки для построения каждого дерева решений. ДР осуществляет прогноз, используя большинство «голосов» отдельных деревьев. Это многомерный непараметрический метод, который хорошо работает с большим количеством переменных [142].

3. Результаты и обсуждение

3.1. Суспензии наночастиц серебра

Суспензии НЧ серебра преимущественно представляли собой прозрачные или слабо опалесцирующие жидкости; суспензии плоских НЧ обладали насыщенным синим цветом, тогда как суспензии сферических НЧ имели желтый цвет, растворы нанокомпозита отличались мутно-розовым цветом.

Большей устойчивостью в широком интервале концентраций обладали суспензии НЧ серебра, стабилизированных хлоридом полигексаметилен-бигуанидина (Ag_III) и талловым амфополикарбоксихлицинатом (Ag_V). Суспензии были устойчивы в течение нескольких месяцев, не проявляли склонность к выпадению серебряной черни и появлению опалесценции. В Таблице 7 приведен перечень водных суспензий НЧ серебра, стабилизированных различными веществами.

Таблица 7. Перечень НЧ серебра, стабилизированных различными веществами

Стабилизирующее вещество/обозначение	С (НЧ), мг/л	С(стабилизатор/НЧ)
Сульфэтоксилат додеканола/ Ag_I	100	10
Хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония / Ag_II	300	2
Полигексаметилен-бигуанидин хлорид/ Ag_III	500	0,2 1
Кокодипропионат натрия/ Ag_IV	100 500	12 5
Талловый амфополикарбоксихлицинат натрия/ Ag_V	3000	2
Талловый амфополикарбоксихлицинат натрия/Ag ₂ Cl_V	2500	2

Условия, обеспечивающие получение стабильных суспензий НЧ, во всех случаях сильно отличаются, несмотря на то, что применялся один и тот же борогидридный метод восстановления. Действительно, анионные стабилизаторы приводят к электростатическому взаимодействию с положительно заряженными ионами серебра на поверхности частицы. В то же время при проведении восстановления НЧ в избытке соли серебра, но в отсутствии галогенид-ионов, поверхность НЧ серебра заряжается положительно за счет специфической

адсорбции ионов серебра. Это создает возможность взаимодействия отрицательно заряженных групп в молекулах стабилизаторов с поверхностью НЧ, что, в свою очередь, приводит к образованию внутреннего стабилизирующего слоя ПАВ (Рисунок 5).

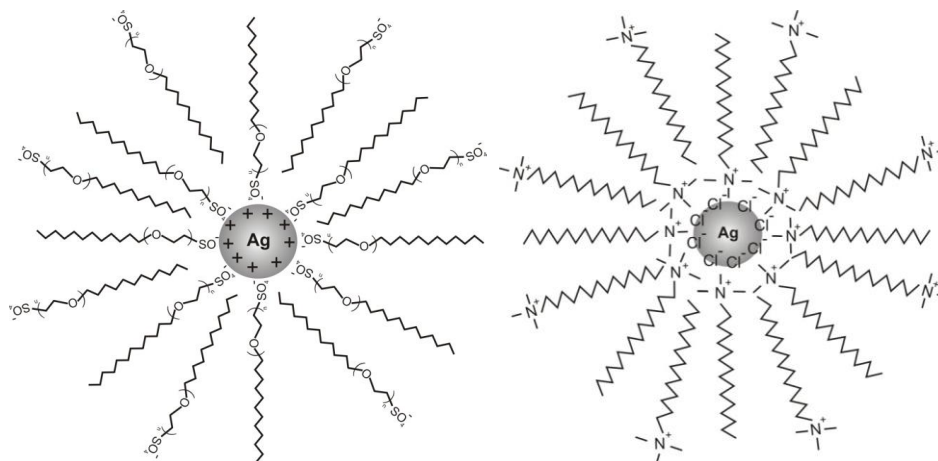


Рисунок 5. Схематичное изображение наночастиц серебра с анионными (слева) и катионными (справа) поверхностно-активными веществами [143], выступающими в качестве стабилизаторов.

Положительно заряженные полимеры, содержащие третичный атом азота в структуре цепи, и амфотерные ПАВ эффективно стабилизируют НЧ серебра за счет образования прочной координационной связи Ag-N [144, 145]. Некоторые стабилизирующие вещества содержали хлорид-ион в качестве противоиона (полигексаметилен-бигуанидин хлорид), либо в качестве примеси (кокодипропионат натрия и талловый амфополи-карбоксивалицинат натрия). Благодаря этому, металлическое ядро НЧ способно приобретать отрицательный заряд за счет адсорбции хлорид-ионов, что приводит к сближению металлического ядра НЧ с положительно заряженной молекулой полимера за счет электростатического взаимодействия с последующим образованием координационной связи.

Исследованные НЧ были проанализированы для определения начальных свойств и физико-химических характеристик НЧ. Суспензии НЧ были исследованы спектрометрически, при этом размер частиц оценивали с помощью ПЭМ и методов DLS и NTA. Измерение ζ -потенциалов проводили путем

наложения электрического поля на кювету с суспензией НЧ серебра с использованием методики, основанной на лазерной доплеровской анемометрии.

3.2. Физико-химические свойства и характеристики наночастиц после их получения и в условиях эксперимента

При анализе токсического действия НЧ особое внимание необходимо уделять их качественной характеристике. В рамках исследовательской работы суспензии НЧ серебра были протестированы рядом физико-химических методов для определения формы НЧ, их распределения по размерам и ζ -потенциала. Качественную характеристику суспензий НЧ проводили с помощью данных спектров светопоглощения в области 200 – 800 нм и дифракции с применением метода «темного поля».

Спектрофотометрия

Спектры поглощения света суспензий НЧ серебра для сферических и плоских НЧ показаны на Рисунке 6. Как видно в случае сферических НЧ наблюдается характерная полоса поглощения в области 400 нм. Для анизотропных НЧ характерно присутствие нескольких полос поглощения в спектре.

Для двух наборов НЧ в зависимости от метода их получения в спектре наблюдаются противоположные тенденции. В случае контроля времени нагрева реакции положение полосы поглощения света НЧ смещалось в коротковолновую область по мере увеличения времени нагрева. Это может быть связано с частичным переходом серебра с поверхности образующихся НЧ в раствор при нагревании и вызванные этим видоизменением формы НЧ. Частицы, не прошедшие термическую обработку, имели более правильные геометрические формы пластин.

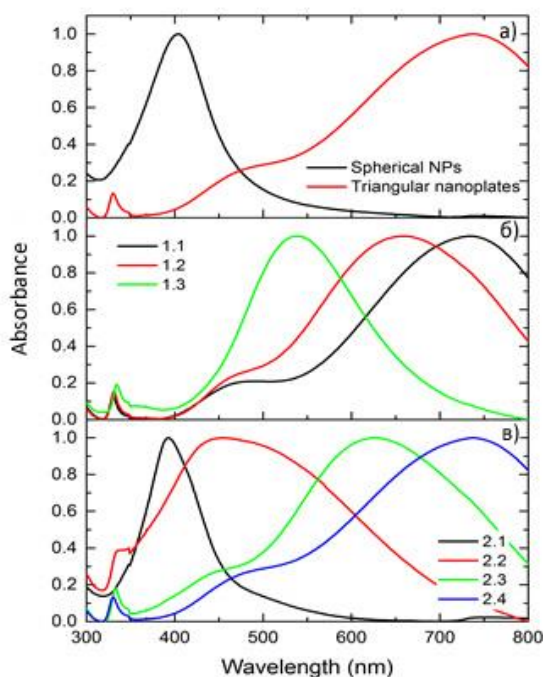


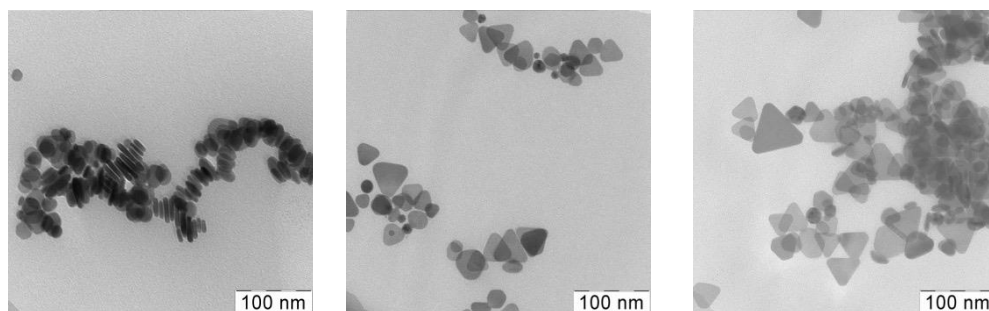
Рисунок 6. Спектры поглощения светового излучения НЧ серебра разной формы в диапазоне световых волн 300 – 800 нм; а - спектры для сферических и плоских НЧ; б – спектры для НЧ, полученных при разном времени нагрева – образцы Ag_1.1; Ag_1.2 и Ag_1.3; в – спектры для НЧ, полученных с разной концентрацией восстановителя NaBH_4 - образцы Ag_2.1; Ag_2.2; Ag_2.3 и Ag_2.4.

Для второго набора НЧ, полученных с варьированием концентрации борогидрида натрия, наблюдали противоположную тенденцию — смещение полосы поглощения света НЧ в длинноволновую область по мере увеличения концентрации восстановителя в растворе. Данный эффект можно объяснить участием цепочек молекул PVP на стадии роста нанокристаллов и укрупнением получаемых НЧ в присутствии избытка восстановителя. Эта особенность действия стабилизатора PVP ранее была отмечена в литературе [146].

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Форму и размер НЧ определяли с помощью метода ПЭМ. Примеры форм полученных нами сферических и плоских НЧ приведены на Рисунке 7.

Плоские
наночастицы
(Ag_2.4)



Сферические
наночастицы
(Ag_3.1)

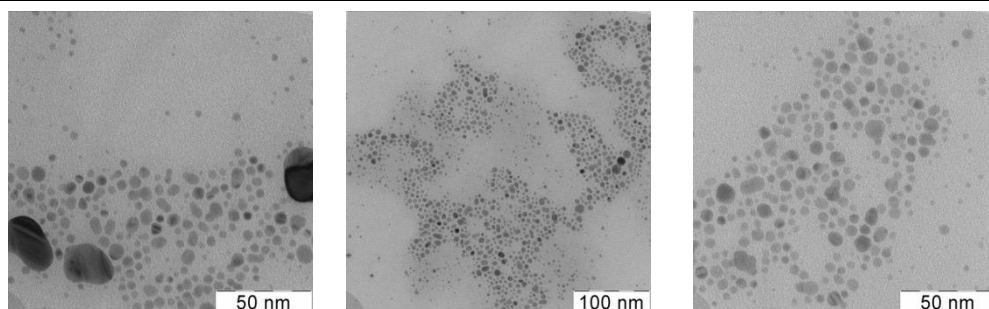


Рисунок 7. Микрофотографии (ПЭМ) сферических и плоских НЧ серебра.

Как показывают микрофотографии ПЭМ, НЧ серебра, полученные в присутствии пероксида водорода, имеют плоскую форму с преобладанием той или иной геометрии. Форма НЧ достаточно разнообразна - от усеченных и равносторонних треугольных призм и до гексагональных образований.

Из микрофотографий ПЭМ были определены средние значения свойств плоских НЧ Ag и типичная форма, отвечающая каждому температурному режиму. Согласно снимкам, можно выделить три набора НЧ с близкими распределениями по размерам и различной формы пластин. В микроскопе наблюдали треугольные призмы, усеченные треугольные и гексагональные призмы в разных пропорциях для разных условий. По мере увеличения температуры раствора количество треугольных форм сокращалось и увеличивалось число НЧ Ag, близких по форме к овалу, а также увеличивалось число структурных дефектов НЧ серебра.

Для образцов Ag_2.1 и Ag_2.2 характерно большее разнообразие форм НЧ в одном растворе, так же как и количество дефектов на поверхности НЧ. Помимо этого, они проявляли меньшую устойчивость, особенно суспензии НЧ с меньшим содержанием восстановителя. Со временем происходило выпадение осадка и потускнение окраски раствора. Данные ПЭМ для второго набора НЧ (образцы №

2.1 и 2.2) показали, что сферические и плоские НЧ овальной формы преобладают в растворах суспензий.

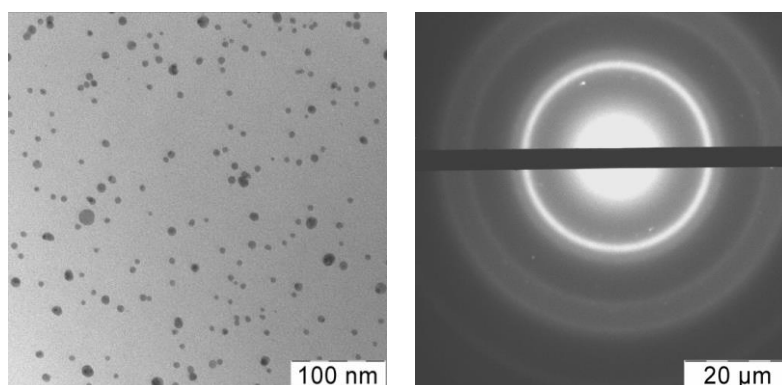


Рисунок 8. Микрофотография (ПЭМ) и микродифрактограмма (метод «черного поля») НЧ серебра, стабилизированных талловым амфополикарбоксихлицинатом.

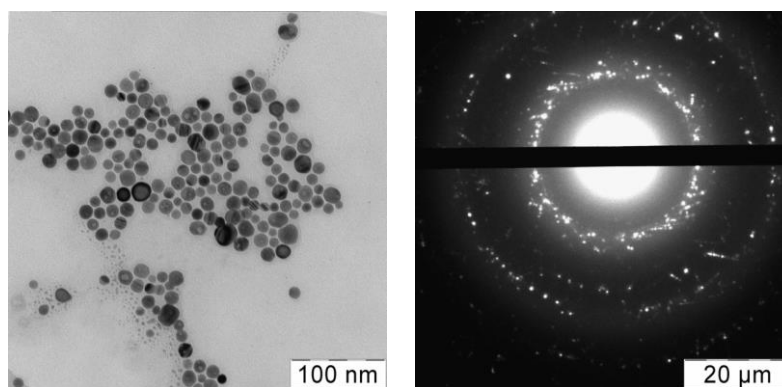


Рисунок 9. Микрофотография (ПЭМ) и микродифрактограмма (Метод «черного поля») наночастиц серебра, стабилизированных хлоридом полигексаметиленбигуанидина (Ag_III с концентрацией стабилизатора 1 мг/л).⁵

В случае частиц наносеребра с разными стабилизаторами наблюдали сферические частицы разного размера. На Рисунках 8, 9 представлены типичные снимки, полученные методом ПЭМ, для двух образцов Ag_III (1 мг/л) и Ag_V.

Микродифрактограммы, полученные для всех исследованных суспензий, свидетельствует о том, что НЧ, хорошо видимые на снимках ПЭМ, образованы кристаллическим серебром.

Динамическое светорассеяние и ζ -потенциал

Для всех суспензий сферических НЧ серебра распределения их по размерам, полученные методом динамического светорассеяния и с помощью метода ПЭМ, достаточно хорошо согласуются. В качестве примера приведены данные для суспензии НЧ серебра, стабилизированных талловым амфополикарбоксиглицинатом (Рисунок 10).

Для плоских НЧ определение их размера осложняется тем, что теоретические расчеты по методу динамического светорассеяния подразумевают, что НЧ имеют исключительно сферическую форму. В связи с этим измерения проводили с оценочной целью и для сравнения суспензий плоских НЧ серебра между собой. Данные, полученные методом динамического светорассеяния, оказались несколько заниженными по сравнению с показателями, измеряемыми по микрофотографиям.

По данным DLS, средний размер частиц наносеребра находился в интервале 20–30 нм, тогда как измерения по микрофотографиям показали средний размер граней НЧ около 70 нм, а для высоты треугольных пластин среднее значение составило около 4-5 нм.

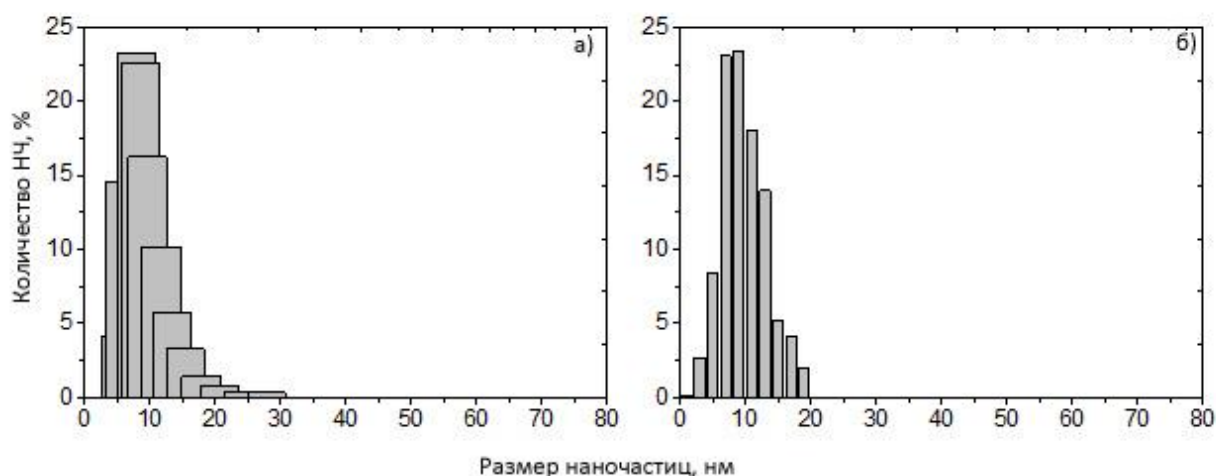


Рисунок 10. Гистограммы распределения наночастиц по размерам, полученные обработкой снимков ПЭМ (а) и методом DLS (б) наночастиц серебра, стабилизированных талловым амфополикарбоксиглицинатом.

Полученные нами распределения по размерам для синтезированных НЧ серебра приведены на Рисунках 11, 12.

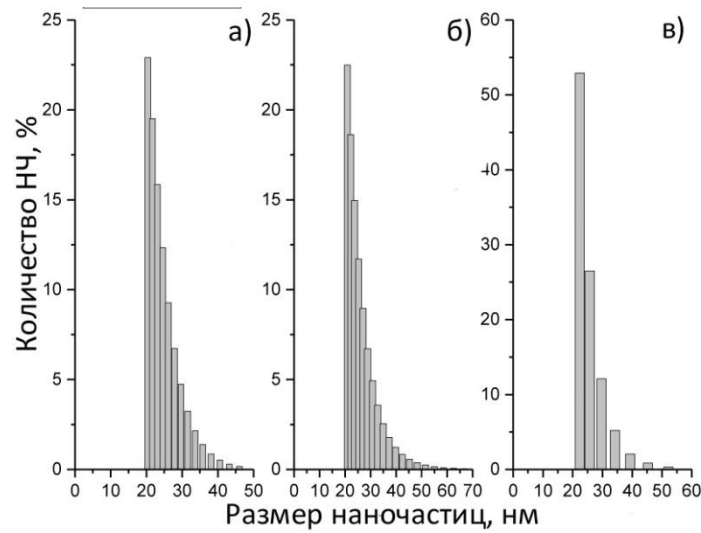


Рисунок 11. Распределение наночастиц по размеру для первого набора НЧ Ag_1.i; а - Ag_1.1, б - Ag_1.2, в - Ag_1.3.

При анализе результатов было установлено, что гистограммы распределения по размерам для НЧ серебра первого и второго набора перекрываются, а средний измеренный размер лежит в интервале 20-50 нм.

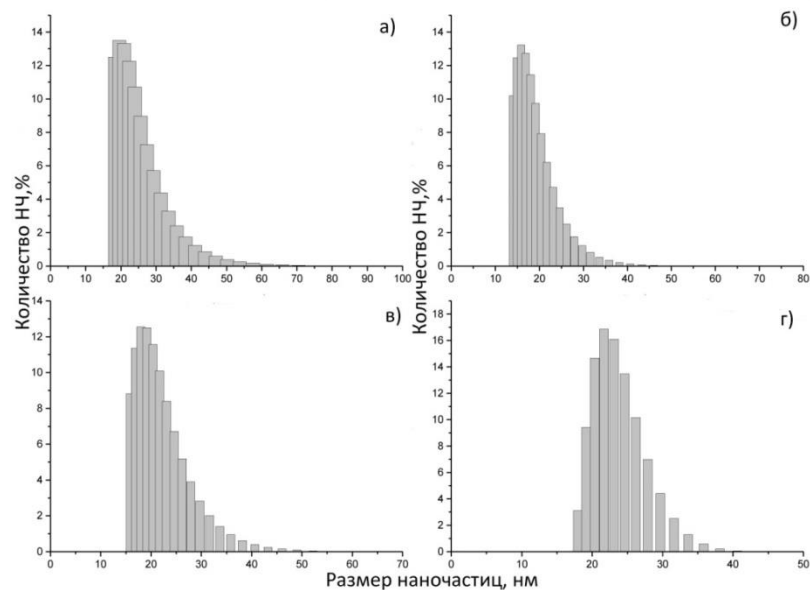


Рисунок 12. Распределение наночастиц по размеру для второго набора НЧ Ag_2.i; а - Ag_2.1, б - Ag_3.2, в - Ag_2.3, г - Ag_2.4.

Одна из основных сложностей работы с НЧ серебра с точки зрения проведения эксперимента и интерпретации результатов по токсичности серебряных НЧ заключается, главным образом, в недостатке информации о свойствах этих НЧ и их состоянии в экспериментальных условиях. Общими

явлениями при приготовлении суспензий НЧ и дальнейшем их разведении являются процессы агрегации и агломерации. Поэтому в ходе эксперимента было необходимо тщательно исследовать свойства НЧ и их физико-химические свойства в условиях постановки эксперимента.

3.3. Агрегативная устойчивость и поведение наночастиц серебра в экспериментальной среде. Дестабилизация плоских наночастиц серебра

Наночастицы предварительно были протестированы с целью выяснения, насколько устойчивы растворы при разведении водой и в инкубационной среде (ИС / EW – E3 стандарт). Для этого путем последовательного разведения готовили растворы одинаковой концентрации для выбранного набора НЧ серебра. Была выбрана рабочая концентрация 10 мг/л. Дополнительно проводили тестирование НЧ с концентрацией 5 мг/л в инкубационной среде для рыб *Danio rerio*. Результаты измерений для плоских НЧ и суспензий с разными стабилизаторами представлены в Таблице 8.

ζ -потенциал, как по абсолютной величине, так и по знаку зависит от химического строения стабилизатора. Катионные ПАВ дают положительные значения ζ -потенциала, тогда как анионные вещества – отрицательные значения, амфотерные же ПАВ показывают самые высокие по абсолютной величине отрицательные значения ζ -потенциала.

По данным спектральных исследований и измерениям DLS, большинство коллоидов НЧ серебра устойчивы при разбавлении водой и добавлении инкубационной среды. Исключение составили образцы Ag_I и Ag_II, стабилизированные сульфэтоксилатом додеканаола и кокодипропионатом натрия (происходила смена цвета раствора и выпадал осадок). У НЧ Ag_III с низкой концентрацией хлорида полигексаметилен-бигуанидина по ходу эксперимента также наблюдали признаки дестабилизации при разбавлении и образование осадка.

Таблица 8. Физико-химические свойства и характеристики суспензий НЧ серебра

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

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

На Рисунке 13 представлены примеры спектральных данных для основных суспензий НЧ серебра.

Природа стабилизатора существенно влияет на устойчивость суспензий НЧ в экспериментальной среде. Вполне очевидно, что имеют место различные механизмы стабилизации НЧ, которые и обуславливают разницу в устойчивости

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

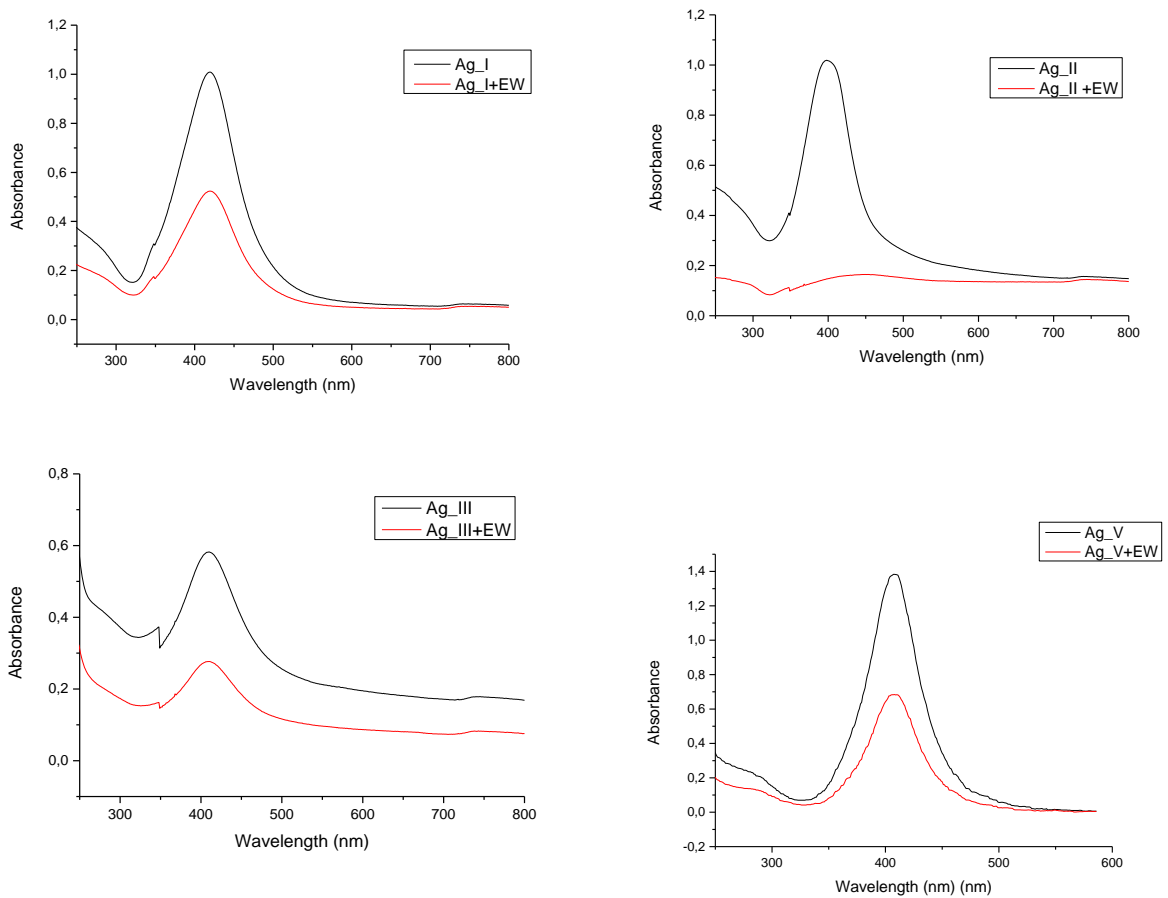


Рисунок 13. Изменение спектров поглощения светового излучения НЧ серебра при разбавлении водой до 10 мг/л и инкубационной средой до 5 мг/л.

Для нанопластин серебра отмечали резкое изменение цвета раствора при добавлении инкубационной среды. Цвет менялся от синего до светло-желтого, т.е. приобретал окраску более характерную для сферических НЧ серебра. Изменение цвета раствора отмечали для всех суспензий плоских НЧ в течение нескольких минут. Образцы растворов были проанализированы при помощи метода ПЭМ. На микрофотографиях, приведенных на Рисунке 14, показано, как меняется форма НЧ серебра в различных экспериментальных средах.

Авторы работы [147] отмечают связь между подобным поведением нанопластин серебра в присутствии хлорид-ионов в растворе. В хлорид-содержащих средах треугольные и гексагональные плоские НЧ приобретают

более сглаженную овальную форму, что сопровождается переходом окраски раствора от синих тонов в желто-оранжевые цвета.

Традиционно для проведения экспериментов по токсичности НЧ серебра в отношении с рыбами *Danio rerio* в качестве инкубационной среды для эмбрионов используют хлориды металлов.

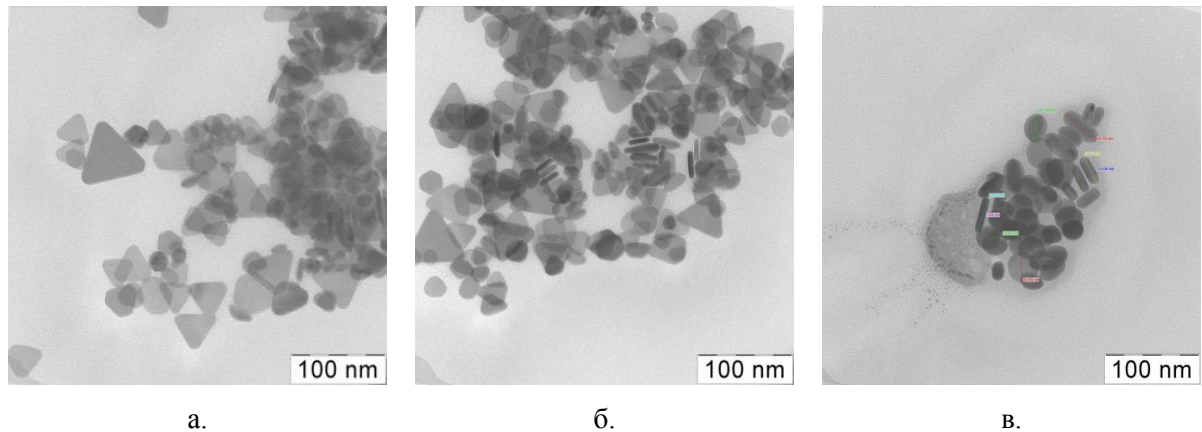


Рисунок 14. Микрофотография (ПЭМ) нанопластин серебра в разных инкубационных средах: а - дистиллированная вода, б - нитратная среда, в - хлоридная среда.

Однако в случае с нанопластинами серебра хлоридная среда не может быть использована в связи со вполне ожидаемым изменением формы НЧ серебра. Поэтому для проведения экспериментов вместо хлоридов были использованы нитратные соли с такими же катионами. Рабочую среду для всех последующих тестов с плоскими НЧ готовили по методике, приведенной в статье [148].

3.4. Предварительные тесты с образцами коммерческих наночастиц серебра Agbion. Отработка методик и выбор объектов исследований

Предварительные экспериментальные исследования проводили с целью выявления чувствительности биологических объектов к НЧ серебра и оптимизации методик для работы с суспензиями НЧ. На этапе отработки методик в качестве тестируемого вещества использовали НЧ серебра компании «Наноиндустрия».

Препарат Agbion представляет собой жидкость бурого цвета со слабым специфическим запахом. Особенностью препарата Agbion является то, что НЧ обладают узким распределением частиц по размеру; вещество обладает бактерицидной, противовирусной и противогрибковой активностью. В Таблице 9 приведены характеристики НЧ серебра, предоставленные производителем, и результаты проведенных измерений.

Таблица 9. Характеристики НЧ серебра Agbion

Показатель	Данные от производителя	Экспериментальные данные
Содержание серебра (Ag), г/л	0,27-0,32	0,28
Содержание ПАВ (диоктилсульфосукцинат натрия), г/л	20-35	27
Положение основной полосы поглощения, нм	400-420	410
Средний размер наночастиц, нм	3-16	14,6
ζ – потенциал (мВ)	—	-81,75

Полученные нами экспериментальные данные подтвердили заявленные производителем характеристики НЧ серебра.

Водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer

Для оценки токсического действия НЧ серебра исходный раствор был разбавлен в 200 раз до оптической плотности $D=0,035$. Это позволило пренебречь влиянием окрашенности раствора на рост культуры водоросли в стандартных условиях. Затем были приготовлены 5 растворов с разведением исходного образца в 3, 9, 27 и 81 раз. Результаты влияния указанного образца на рост культуры представлены в Таблице 10.

Безопасная кратность разбавления (БКР) для образца Agbion составила 4200 раз. Таким образом, безвредная концентрация препарата Agbion составляет 0,07 мг/л [149]. Для раствора стабилизатора (27 г/л) БКР составила 380 раз, т.е. безвредная концентрация диоктилсульфосукцината натрия - 71 мг/л, что соответствует концентрации препарата Agbion 0,74 мг/л.

Таблица 10. Действие растворов препарата Agbion и диоктил-сульфосукцината натрия на рост культуры водоросли *C. vulgaris Beijer*

Кратность разбавления исходного раствора	Оптическая плотность культуры водоросли D, в % величины в контрольном опыте			
	Agbion		Диоктилсульфосукцинат натрия	
	D	[Ag], мкг/л	D	концентрация, мг/л
1	0,0*	1,400	0,0*	2700
3	0,0*	0,476	11,0*	900
9	21,0*	0,159	22,0*	300
27	104,0	0,0532	74,0*	100
81	105,0	0,0168	92,0	33
БКР	21		38	
* – в образце превышен критерий токсичности (подавление роста культуры более, чем на 20%) БКР для Agbion = 4200 (21 x 200)				

Однако токсическое действие стабилизатора на водоросли на порядок меньше, чем отравляющее действие препарата Agbion. Из приведенных результатов следует, что токсическое действие препарата Agbion на *C. vulgaris Beijer* обусловлено совместным действием стабилизатора и коллоидного раствора НЧ серебра.

Двусторчатые моллюски *Unio tumidus*

В серии экспериментов определяли показатели токсичности препарата Agbion, содержащего НЧ серебра, стабилизированные диоктил-сульфосукцинатом натрия. В эксперименте концентрация серебра составляла 100 мг/л. Это было выбрано, исходя из литературных данных о медицинском применении коллоидного серебра. Затем были приготовлены растворы с концентрацией серебра 0,25, 0,5 и 0,75 мг/л. Каждая группа моллюсков содержалась в растворе с заданной концентрацией до момента достижения гибели половины из них. Состояние моллюсков контролировали как визуально, так и с помощью прибора ПКФР-ОС-6К, который позволяет измерить сердечные и дыхательные ритмы.

По данным кардиограмм определяли время гибели половины организмов и рассчитывали полуметальную дозу ЛД₅₀ для различных концентраций серебра в растворе препарата Agbion (Таблица 11).

Для проверки влияния НЧ серебра на состояние моллюсков изучали динамику накопления серебра в тканях перловицы клиновидной (Таблица 12, Таблица 13Таблица 12). После окончания эксперимента проводили химический анализ и определяли количество серебра, накопленного в тканях печени и жабр.

Таблица 11. Полулетальная доза препарата НЧ серебра Agbion в отношении моллюсков

Концентрация серебра	Время гибели
0,75 мг/л	ЛД ₅₀ -27 часов
0,5 мг/л	ЛД ₅₀ -60 часов
0,25 мг/л	ЛД ₅₀ -87 часов
0,1 мг/л	7 дней (все животные живы)

Как видно, при увеличении концентрации серебра в растворе происходит монотонное накопление металла в жабрах и печени моллюсков. В ходе препарирования было установлено, что у некоторых моллюсков ткани имеют серый цвет, что является характерным признаком при накоплении серебра.

Таблица 12. Накопление серебра в жабрах перловицы клиновидной при нахождении моллюсков в водных суспензиях с различной концентрацией препарата Agbion

Концентрация серебра, мг/л	Содержание серебра в жабрах				
	Контрольный опыт	0,1	0,25	0,5	0,75
1	0,023	0,59	4,6	4,2	2,7
2	0,029	0,86	1,9	2,8	4
3	0,031	0,32	2,8	2,7	7,8
4	0,025	0,47	1,3	7,2	1,8
5	0,03	0,27	1,2	4,5	6
6	0,017	0,37	4	2,1	1,6
7	0,038	0,33	1,2	3,1	2,3
8	0,04	0,7	1,8	3,1	1,5
9	0,023	0,34	3,8	6,1	4,1
10	0,029	0,9	2,9	1,9	6,2
Среднее значение	0,0285	0,515	2,55	3,77	3,8
σ^2	0,0052	0,198	1,07	1,384	1,82

Эксперименты показали, что сам стабилизатор имеет достаточно высокую токсичность, практически такую же, как и раствор Agbion, при этом накопление серебра в тканях моллюсков под воздействием НЧ серебра значительно выше.

Таблица 13. Накопление серебра в печени перловицы клиновидной при нахождении моллюсков в водных суспензиях с различной концентрацией Agbion

Концентрация серебра, мг/л	Содержание серебра в печени				
	Контрольный опыт	0,1	0,25	0,5	0,75
1	0,038	8,6	0,37	0,88	0,93
2	0,023	0,18	0,3	0,64	0,41
3	0,012	0,22	0,25	0,62	0,24
4	0,009	2,8	0,29	0,68	0,21
5	0,021	0,16	0,3	0,31	0,35
6	0,027	0,16	0,32	0,85	0,14
7	0,028	6,4	0,23	0,53	0,4
8	0,023	5	0,35	0,73	0,21
9	0,03	0,17	0,2	0,72	0,1
10	0,032	0,15	0,2	0,41	0,49
Среднее значение	0,0243	2,384	0,281	0,637	0,334
σ^2	0,0067	2,6528	0,0488	0,1356	0,168

Процесс накопления серебра в разных органах идет по-разному и он зависит от концентрации металла в растворе. В среднем содержание серебра в жабрах моллюсков превышает количество серебра в печени. Это объясняется тем, что жабры имеют прямой первичный контакт с НЧ серебра в среде, а их реснитчатый эпителий создает прямой ток воды к ротовому отверстию, после чего серебро может напрямую попадать в протоки печени через пищевой тракт. Процесс накопления серебра в печени, в отличие от накопления в жабрах, характеризуется повышением вариабельности содержания серебра у индивидуальных моллюсков.

Плоские черви планарии *Jirardia tigrina*

Вначале были определены минимальные токсические концентрации (МТК) для препарата Agbion и стабилизатора. Было установлено, что суспензии НЧ Ag не проявляют токсичности в отношении плоских червей при разбавлении исходной суспензии НЧ серебра до 10^{-4} [150]. Поэтому при постановке экспериментов по регенерации планарий использовали раствор препарата Agbion с разбавлением 10^{-5} . Исходя из результатов предварительных экспериментов, именно такая концентрация препарата Agbion является токсичной для декапитированных планарий. В качестве контроля наблюдали за регенерацией головной части тела в культуральной среде (Рисунок 15).

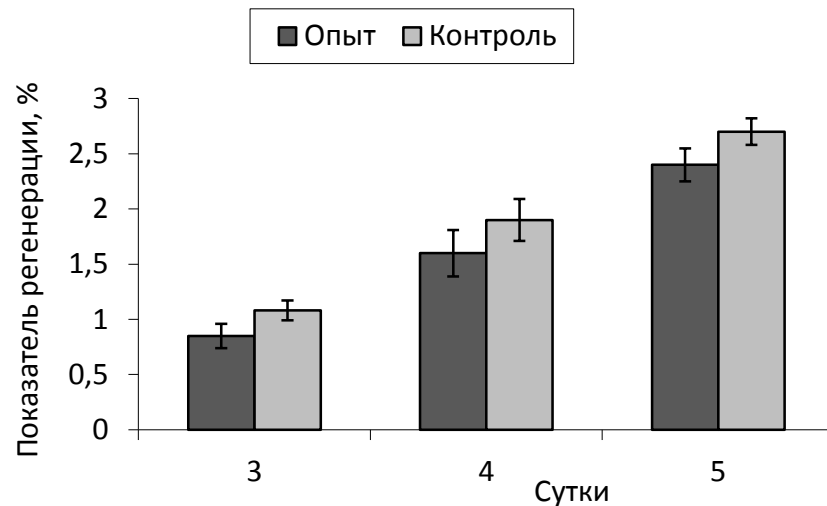


Рисунок 15. Сравнение показателей регенерации головной части тела планарии на 3-и, 4-е и 5-е сутки в опыте и контрольном эксперименте при использовании раствора наночастиц серебра Agbion с разбавлением 10^{-5} .

При использовании модели регенерации головного отдела у планарий при действии НЧ серебра в одинаковых разведениях наблюдалось торможение процесса регенерации. Суммарные данные проведенных исследований представлены в Таблице 14.

Таблица 14. Морфометрические параметры регенерирующих головных частей планарий после декапитации при воздействии наночастиц серебра в концентрации $10^{-5}M$

Морфометрические показатели	Показатели	Контроль (3-ий день) (n=14)	Контроль (4-ый день) (n=14)	Контроль (5-ый день) (n=14)	$10^{-5}M$ (3-ий день) (n=12)	$10^{-5}M$ (4-ий день) (n=12)	$10^{-5}M$ (5-ий день) (n=12)
Площадь декапитированных животных, усл.ед.	M±m	25153,8±1508,0	23078,2±1247,8	26229,2±1643,1	22882,6±1620,6	24879,9±1106,7	22919,1±1209,2
	t				1,03		1,54
Площадь бластемы, усл.ед.	M±m	268,8±23,7	444,6±44,1	712,6±44,7	184,5±22,2	400,0±58,3	542,1±42,0
	t				2,57	0,60	2,67
Критерий регенерации R,%	M±m	1,08± 0,09	1,95±0,19	2,70±0,12	0,85± 0,11	1,58±0,19	2,37±0,14
	t				1,67	1,31	1,94
Эффект действия вещества, %					-21,61	-19,19	-13,43

M – среднее арифметическое значение показателя, m – стандартная ошибка, n – число особей в экспериментальной группе, t – величина критерия Стьюдента-Фишера.

Эффект действия вещества вычисляется как отношение разности величин критерия регенерации в опытной и контрольной группах к контрольной группе и выражается в %.

Биологическая направленность эффекта регенерации показана в виде знаков: «-» торможение регенерации и «+» - стимуляция регенерации.

В случае отрастания головной части тела планарий в растворе с добавлением вещества Agbion показатель регенерации на третий день составлял -21% по отношению к контрольной группе планарий, на пятый день этот показатель уменьшился до -13% ($p < 0,05$). Таким образом, на фоне общего эффекта подавления регенерации планарий наблюдалось его снижение (Рисунок 16).

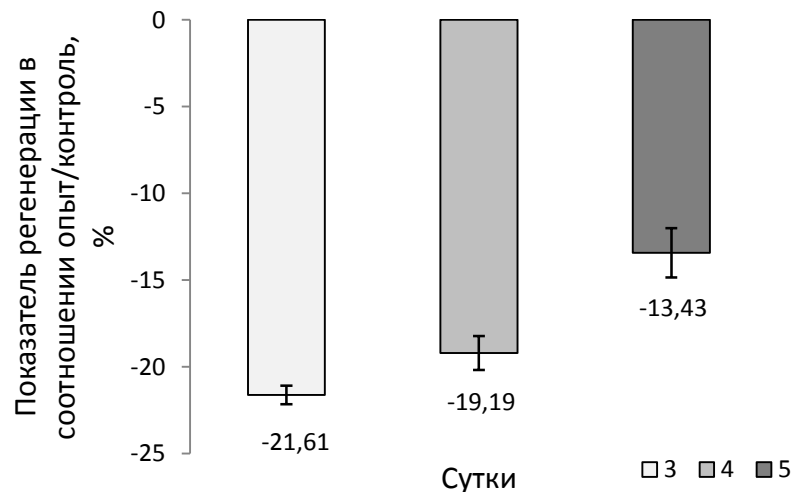


Рисунок 16. Эффект уменьшения скорости регенерации головной части тела планарий *J. tigrina* в присутствии НЧ серебра препарата Agbion.

При разбавлении в 10^{-5} препарата Agbion и стабилизатора отмечали существенное подавление роста бластемных клеток. Для раствора стабилизатора (разбавление 10^{-6}) токсический эффект не наблюдали. Согласно данным экспериментам, суспензии серебряных НЧ можно отнести к веществам средней токсичности (биологически активным в относительно высокой концентрации).

Пресноводные рачки *Daphnia magna*

Для оценки токсического действия образцов в отношении *Daphnia magna* был приготовлен ряд растворов путем последовательного разбавления исходной суспензии НЧ серебра Agbion. Результаты экспериментов приведены в Таблице 15.

Таблица 15. Оценка токсичности растворов препарата Agbion в отношении *Daphnia magna*

№ пробы	Содержание серебра в препарате Agbion, (мг/л)	Степень гибель, %			
		Срок наблюдения (в часах)			
		24	48	72	96
1	28,0	100	100	100	100
2	2,8	100	100	100	100
3	0,28	60	100	100	100
4	0,14	60	60	80	80
5	0,07	0	0	0	20
6	0,028	0	0	0	0
7	0,014	0	0	0	20
8	0,007	0	0	0	0
9	0,0028	0	0	20	60
Представлены средние значения 3-х независимых экспериментов					

В качестве критерия сильного токсического действия в случае *Daphnia magna* принимали гибель 50% и более гидробионтов, при этом в контрольной группе гибель не должна была превышать 10%.

В Таблице 16 представлены результаты определения токсичности диоктилсульфосукцината натрия, используемого в качестве стабилизатора в препарате Agbion, в отношении *Daphnia magna*.

Таблица 16. Оценка токсичности растворов диоктилсульфосукцината натрия для *Daphnia magna*

№ пробы	Концентрация диоктилсульфосукцината натрия в пробе, мг/л	Степень гибель, %			
		Срок наблюдения (сутки)			
		1	2	3	4
1.	1350	100	100	100	100
2.	675	100	100	100	100
3.	270	100	100	100	100
4.	135	100	100	100	100
5.	67,5	100	100	100	100
6.	27,0	70	70	80	100
7.	13,5	30	40	60	90
8.	6,75	0	0	0	20
9.	2,70	0	0	0	0
10.	1,35	0	0	0	0
Примечание: в таблице представлены средние значения 3-х независимых экспериментов					

На основании полученных данных можно заключить, что присутствующие в препарате Agbion НЧ серебра оказывают на *Daphnia magna* сильное токсическое действие. Из полученных данных следует, что среднее значение концентрации стабилизатора, вызывающее гибель 50% *Daphnia magna* при экспозиции в 4 суток (96 час), составляет $9,5 \pm 1,7$ мг/л, тогда как безвредная концентрация $БК_{10-96} = 5,7 \pm 1,1$ мг/л.

Зная показатели токсичности препарата Agbion, можно рассчитать содержание стабилизатора в препарате при среднетоксической и безвредной концентрациям. В Таблице 17 представлены расчетные значения показателей токсического действия исследованных препаратов, полученные на основании экспериментальных данных. Результаты расчетов показывают, что биологическая активность диоктилсульфосукцината натрия линейно зависит от его концентрации, в отличие от препарата Agbion, содержащего НЧ серебра.

Таблица 17. Показатели токсического действия препарата Agbion и диоктилсульфосукцината натрия на *Daphnia magna*

Препарат	Расчетные значения показателей токсичности	
	ЛК ₅₀₋₉₆	БК ₁₀₋₉₆
Agbion	$0,12 \pm 0,02$ мг/л	$0,05 \pm 0,01$ мг/л
Agbion, в пересчете на содержание стабилизатора	$11,60 \pm 1,90$ мг/л	$4,9 \pm 1,0$ мг/л
Стабилизатор диоктилсульфосукцинат натрия	$9,50 \pm 1,70$ мг/л	$5,70 \pm 1,10$ мг/л

Как видно показатели токсичности для Agbion ЛК₅₀₋₉₆ и БК₁₀₋₉₆ составляют для *Daphnia magna* соответственно, $0,12 \pm 0,025$ мг/л и $0,050 \pm 0,011$ мг/л. В пересчете на содержание диоктилсульфосукцината натрия значения ЛК₅₀₋₉₆ и БК₁₀₋₉₆ составляют соответственно, $11,6 \pm 1,9$ мг/л и $4,9 \pm 1,0$ мг/л, что с учетом погрешности не отличается от характеристик токсического действия самого стабилизатора [151].

Обращает на себя внимание увеличение процента смертности гидробионтов при достижении низких концентраций НЧ серебра в растворе

(Таблица 16). Это может быть связано с бифуркационной зависимостью токсичности от концентрации, когда токсичность при высоких концентрациях обусловлена, в основном, присутствием стабилизатора, а при низких концентрациях проявляется токсический эффект собственно НЧ серебра. Можно предположить, что 100% гибель гидробионтов вызывается совместным действием всех компонентов препарата.

Рыбы *Danio rerio*

Ряд исследований был посвящён изучению токсического действия препарата Agbion в отношении рыб, в частности была исследована зависимость гибели эмбрионов, скорости выклева и количества морфологических отклонений от концентрации НЧ серебра. Результаты экспериментов для рыб *Danio rerio* представлены на Рисунке 17.

Следует отметить, что в самом разбавленном растворе наблюдалось увеличение показателя смертности, по сравнению с растворами с соседними концентрациями. Однако процент гибели не превышал 10%, в этих пределах наблюдалась естественная гибель эмбрионов, не связанная с вредным воздействием химических веществ [130]. В то же время, наблюдаемый эффект схож с эффектом увеличения токсичности в области низких концентраций НЧ серебра, который имел место в случае *Daphnia magna*. С этим согласуется и бифуркационный вид зависимости скорости выклева эмбрионов из оболочки икринок со вторым максимумом в области очень низких концентраций серебра. Как и в случае с *Daphnia magna*, это может быть связано с токсическим эффектом НЧ серебра в области низких концентраций.

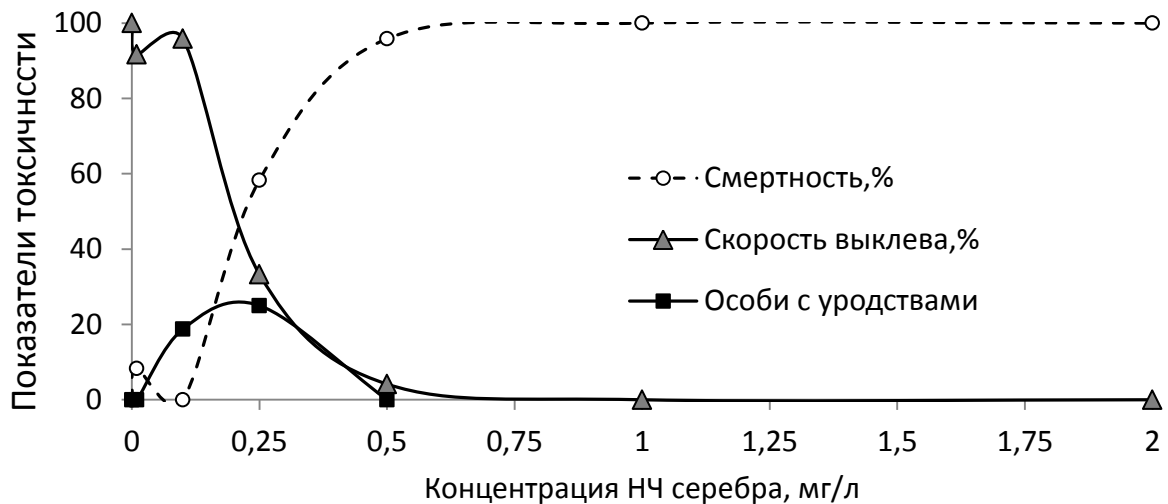


Рисунок 17. Эмбриотоксичность наночастиц серебра препарата Agbion в отношении рыб *Danio rerio* в зависимости от концентрации наночастиц в инкубационной среде.

У выживших особей были выявлены задержки скорости выклева икринок и характерные дефекты, такие как укороченное тело и сколиозное искривление хребта. Процент дефектов у особей возрастал по мере увеличения концентрации серебра. Данные по токсичности стабилизатора для рыб были взяты из сопроводительной информации по безопасности вещества ($LC_{50}(96 \text{ ч}) = 20\text{-}40 \text{ мг/л}$).

Таким образом, на предварительном этапе был проведен сравнительный анализ методик по тестированию экотоксичности НЧ серебра на примере коммерческих образцов препарата Agbion. Все биологические объекты проявили высокую чувствительность к присутствию в среде НЧ серебра. Кроме того, наблюдалось существенное токсическое влияние самого стабилизатора на все тест – объекты (Таблица 18).

Таблица 18. Данные предварительных тестирований для пяти тест-объектов

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

Для дальнейшей работы с основным набором НЧ серебра было решено использовать методику с эмбрионами рыб *Danio rerio*. Методика работы с данными объектами хорошо изучена и рекомендована для тестирования экологического воздействия различных вредных веществ.

3.5. Экологическая токсичность наночастиц серебра в отношении гидробионтов

По данным статей [152, 153] значение LC₅₀ для НЧ серебра в отношении рыб может значительно варьироваться. Различия в некоторых случаях составляют несколько порядков. Поэтому изначально проводили эксперимент в широком интервале концентраций.

Влияние формы наночастиц серебра на токсичность

Как уже отмечалось выше, особенностью приготовления растворов, содержащих НЧ серебра различной формы, была замена солей соляной кислоты на соответствующие нитратные соли. В среде, содержащей хлорид-ион, наблюдали изменение формы НЧ серебра (Рисунок 18), при этом происходило изменение цвета растворов в течение нескольких минут.

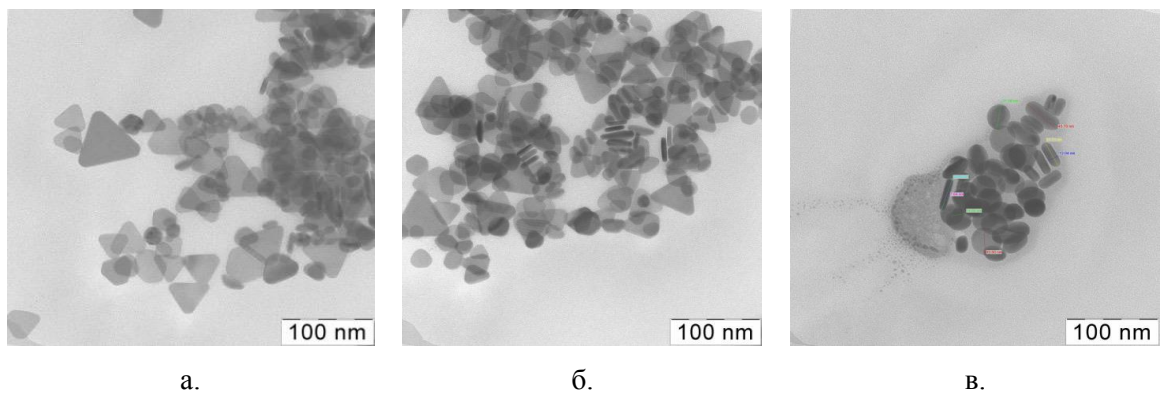


Рисунок 18. Микрофотографии (ПЭМ) НЧ серебра в различных жидких средах: а – дистиллированная вода, б – нитратная среда, в – хлоридная среда.

Данный эффект связывают с влиянием хлорид-ионов на форму НЧ серебра [147]. Поэтому в качестве среды для содержания икры рыб использовали раствор нитратных солей. В этом случае изменения цвета не происходило и форма НЧ не менялась.

Образцы НЧ Ag_1.i и Ag_2.3 и Ag_2.4 использовали для токсикологических исследований по выявлению влияния формы НЧ на развитие икринок рыб.

На этапе определения рабочего интервала концентраций было установлено, что значения полулетальной концентрации (LC_{50}) для растворов разных плоских НЧ лежат в одном интервале концентраций.

На основании сопоставительных данных по токсическому действию плоских и сферических НЧ серебра на эмбрионов рыб *Danio rerio*, представленных на Рисунке 19, можно заключить, что растворы, содержащие

нанопластины серебра, вызывают одинаковый токсический эффект у эмбрионов рыб, вне зависимости от формы пластин и условий их получения.

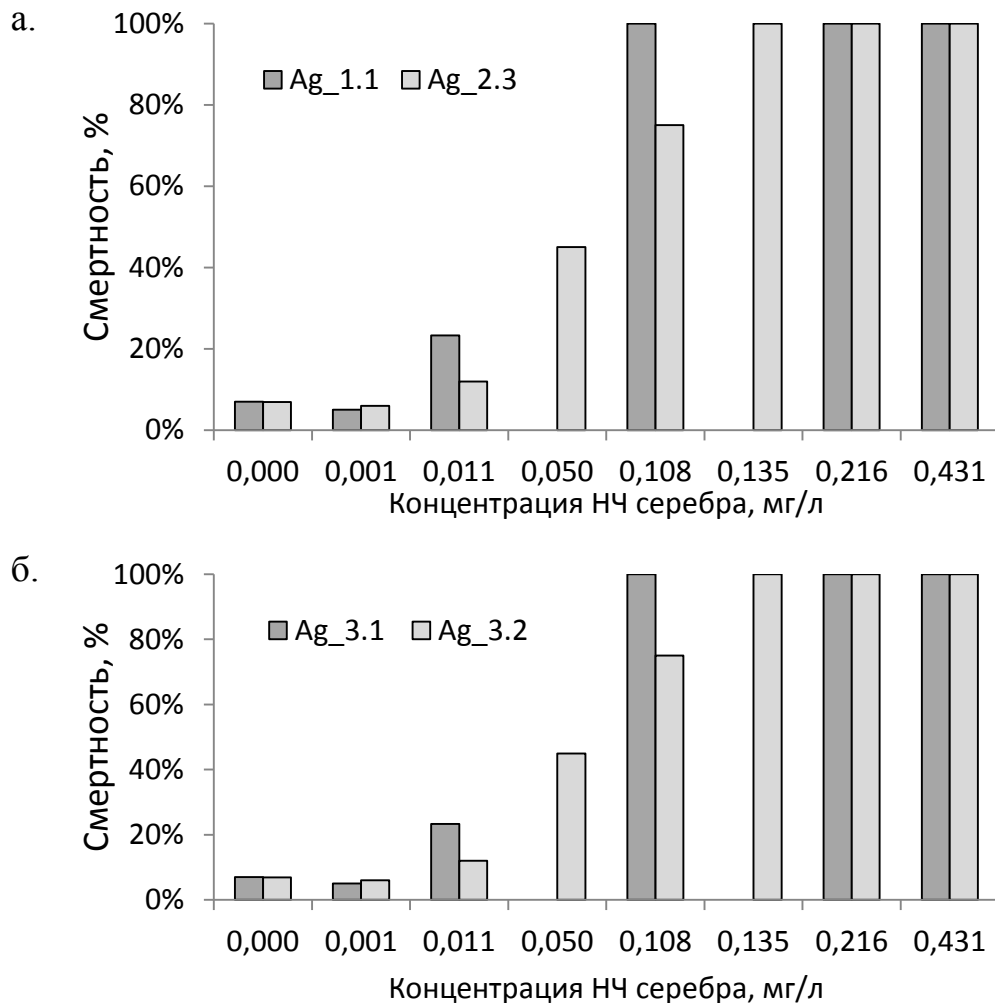


Рисунок 19. Сравнительные данные по токсичности различных плоских (а) и сферических (б) НЧ серебра в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*.

Аналогичные результаты наблюдали и в случае сферических частиц наносеребра, полученных при разных условиях восстановления (химических и физико-химических). Несмотря на различия в методах получения, размеры НЧ отличались незначительно, и эти различия не повлияли на результаты тестирования. Независимо от условий синтеза НЧ серебра, суспензий НЧ одной формы оказывали одинаковое воздействие на развитие икры, поэтому

основной эксперимент проводили для одного образца каждой формы частиц (НЧ Ag_2.4 и Ag_3.1).

Для установления механизма действия растворов НЧ серебра отдельно анализировали влияние растворов стабилизаторов на развитие икры. Для выявления влияния ионов серебра на токсичность растворов анализировали смертность в надосадочном растворе после осаждения НЧ Ag. Для этого НЧ серебра центрифугировали при скорости вращения центрифуги 20.000 оборотов в минуту в течение часа и отбирали надосадочный раствор.

Полученные данные для НЧ были сопоставлены с данными по токсичности ионного серебра (нитратная соль), а также показателями токсичности для стабилизаторов и надосадочного слоя. На Рисунке 20 представлены объединенные показатели для НЧ серебра и нитрата серебра.

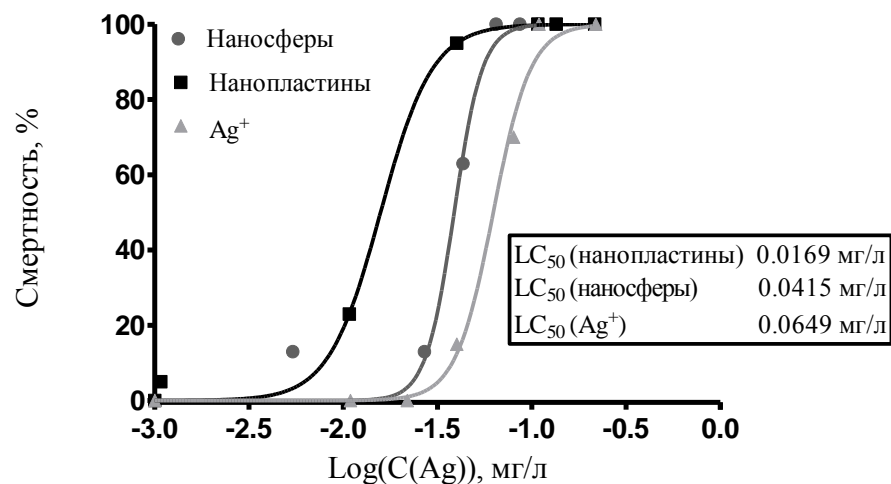


Рисунок 20. Зависимость показателя смертности эмбрионов *Danio rerio* в присутствии плоских и сферических НЧ серебра, а также ионов серебра в виде нитратной соли от концентрации серебра в растворе в полулогарифмических координатах.

Как показывают данные, обе формы НЧ серебра проявляют большую токсичность, чем ионы серебра. Показатели смертности эмбрионов рыб, полученные в экспериментах с растворами стабилизаторов и надосадочной жидкостью^{††} (Рисунок 21), оказались сопоставимыми с естественной гибелью особей в контрольном опыте (инкубационной среде). Тестируемые растворы

^{††} Содержание серебра в надосадочном слое не превышает 0,02 мкг/л.

стабилизаторов и надосадочного слоя имели концентрации, близкие к точке, отвечающей 100% гибели эмбрионов рыб в растворах плоских НЧ серебра.

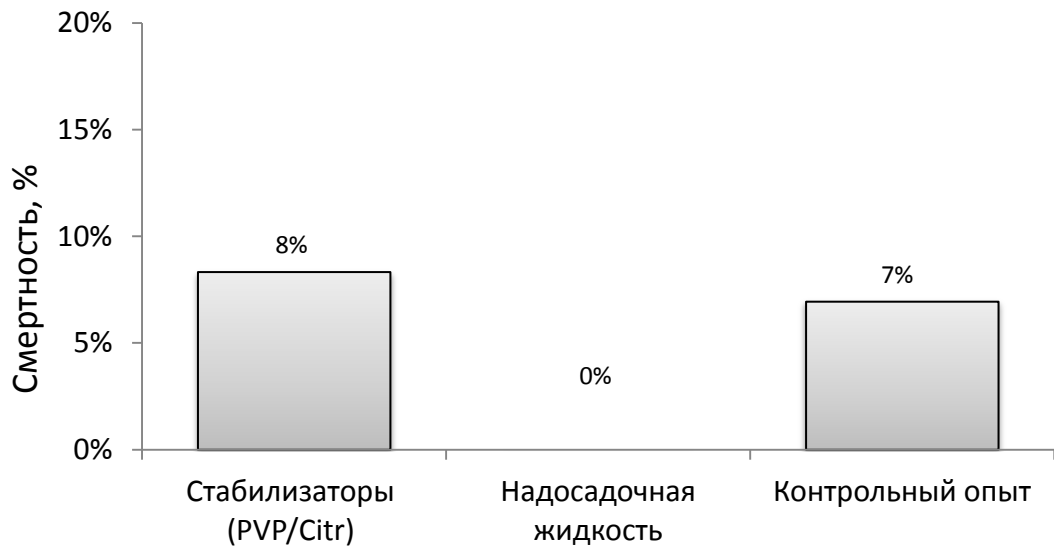


Рисунок 21. Показатели смертности эмбрионов рыб *Danio rerio* в растворе стабилизаторов, в надосадочном слое жидкости и в контрольном опыте.

Согласно полученным данным (Рисунок 21), процент гибели эмбрионов рыб в среде стабилизаторов и в контрольном эксперименте существенно не отличаются, 8 и 7%, соответственно, а смертность составляет менее 10%, что практически соответствует допустимой естественной гибели эмбрионов. Можно сделать вывод, что концентрация стабилизаторов сравнительно мала, чтобы оказать существенное токсическое воздействие на эмбрионы рыб. Поэтому токсическим эффектом стабилизаторов в растворе НЧ серебра можно пренебречь. Если считать, что растворы стабилизаторов не оказывают существенного влияние на развитие икры, то можно предположить, что смертность в популяции вызвана, главным образом, соединениями серебра, находящимися в растворе. Примечательно, что раствор надосадочной жидкости, разбавленный до концентрации, в которой для исходного раствора НЧ серебра получена 100% смертность тестируемых особей, тоже не вызывает гибели эмбрионов.

Для оценки значения LC_{50} эмбриональная смертность была проанализирована с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Расчетные значения полулетальной концентрации для плоских НЧ серебра оказались ниже, чем для сферических НЧ серебра (Рисунок 20). Это говорит о более выраженной токсичности плоских НЧ серебра в отношении эмбрионов, по сравнению со сферическими НЧ и ионами серебра.

Из концентрационных зависимостей были рассчитаны значения полулетальной концентрации для НЧ серебра различной объемной формы и ионов серебра. Показатель LC_{50} для сферических и плоских НЧ серебра составили, соответственно 0,041 мг/л и 0,017 мг/л. Значение же LC_{50} для ионов серебра составило 0,065 мг/л. Полученные данные хорошо согласуются с результатами, приведенными в статье [71], согласно которым плоские НЧ являются более токсичными в отношении эмбрионов рыб, чем сферические НЧ серебра. Подобную разницу авторы объясняют большим количеством структурных дефектов на поверхности плоских НЧ и связанной с этим большей вероятностью перехода серебра из НЧ в ионную форму. Для нашего случая данное объяснение не приемлемо, так как, согласно нашим данным, НЧ серебра более токсичны по сравнению с ионами серебра. Большую активность нанопластин серебра можно объяснить большим количеством атомов, обладающих свободной энергией на поверхности плоских НЧ серебра. На вершинах и ребрах нанопластин серебра располагаются координационно ненасыщенные атомы, которые являются центрами активации свободных радикалов и активных форм кислорода. Активные формы кислорода способны проявлять высокую токсичность в отношении живых организмов. Таким образом, вполне очевидно, что при плоские НЧ серебра более токсичны по сравнению с ионами серебра и сферическими НЧ.

У выживших особей отмечали снижение скорости выклева эмбрионов из оболочки икры при увеличении концентрации НЧ серебра. В растворах наносеребра наблюдали типовые фенотипические изменения. При органогенезе имели место характерные отклонения для всех НЧ серебра, в частности сколиозное искривление и укороченное тело. Количество

отклонений возрастало с увеличением концентрации серебра. В контрольной группе рыб никаких отклонений в развитии не было замечено.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что наличие наноразмерных частиц серебра оказывает сильное токсическое действие на процессы эмбриогенеза. При этом серебряные нанопластины проявляют больший токсический эффект, чем сферические НЧ серебра. Полученные данные позволяют заключить, что сами НЧ серебра являются носителями токсичности для эмбрионов рыб *Danio rerio*.

При этом важно иметь виду, что форма НЧ, их размер, поверхностный заряд и другие свойства НЧ во многом зависят от выбора стабилизатора и условий получения НЧ.

Влияние стабилизирующего вещества на токсичность НЧ серебра

Природа стабилизатора существенным образом влияет на агрегативную устойчивость, размер НЧ и свойства, а также на токсические свойства НЧ. В работе [154] показано, что совместное действие стабилизатора и наносеребра приводит к синергетическому увеличению антибактериальной активности. Нами было получено несколько суспензий НЧ серебра с одинаковыми стабилизаторами, но с разной концентрацией стабилизирующего агента и изучено их суммарное токсическое действие на эмбрионы рыб.

На Рисунке 22 представлена токсичность НЧ Ag, в присутствии стабилизатора кокодипропионатом натрия (Ag_IV), имеющего разную концентрацию. Как видно, у данного стабилизирующего вещества нет выраженной токсичности по отношению к рыбам. В сопроводительной информации указывается, что значение полулетальной концентрации для кокодипропионата натрия превышает 10,7 мг/л.

Исходя из данных, представленных на Рисунке 22, можно заключить, что токсичность коллоидных растворов НЧ серебра, имеющих разные концентрации стабилизаторов, сравнительно близки. Причем, в экспериментах с растворами чистых стабилизаторов мы наблюдали 100%

смертность рыб для более концентрированного раствора (12 мг/л Ag_IV) и 3% смертность в растворе с низкой концентрацией (5 мг/л Ag_IV).

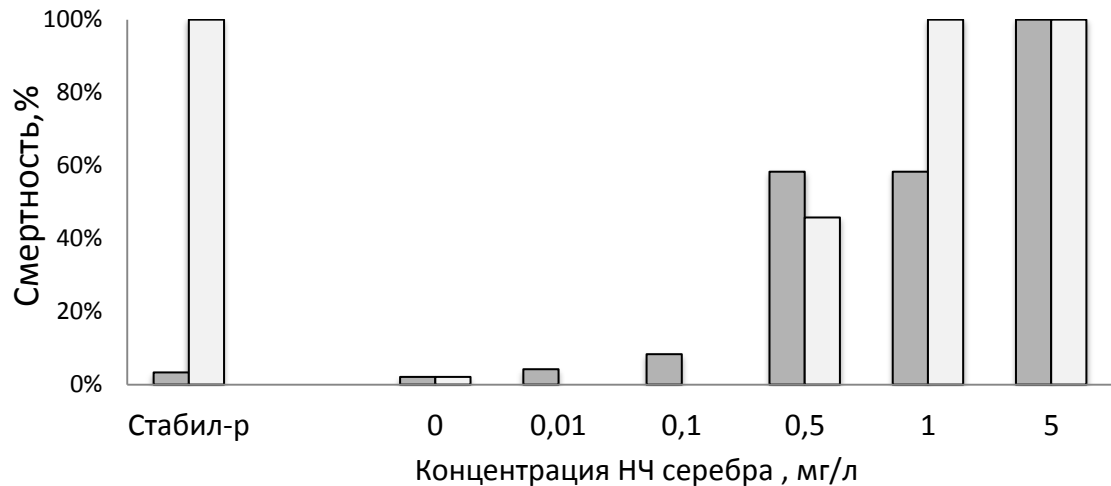


Рисунок 22. Данные по токсичности наночастиц серебра, стабилизированных кокодипропионатом натрия с концентрациями 5 мг/л (■) и 12 мг/л (□).

Расчетные значения LC_{50} для растворов Ag_IV с концентрациями 5 мг/л и 12 мг/л составили, соответственно, 0,580 и 0,515. Отсюда можно заключить, что для растворов Ag_IV токсическое воздействие на рыб *Danio rerio*, оказывает само серебро вне зависимости от концентрации стабилизатора.

Совершенно иной результат был получен для НЧ серебра, стабилизированных хлоридом полигексаметиленбигуанида. Количество стабилизатора в растворах отличалось в несколько раз, поэтому концентрационные зависимости для двух суспензий НЧ серебра (Ag_III) расположены далеко друг от друга (Рисунок 23).

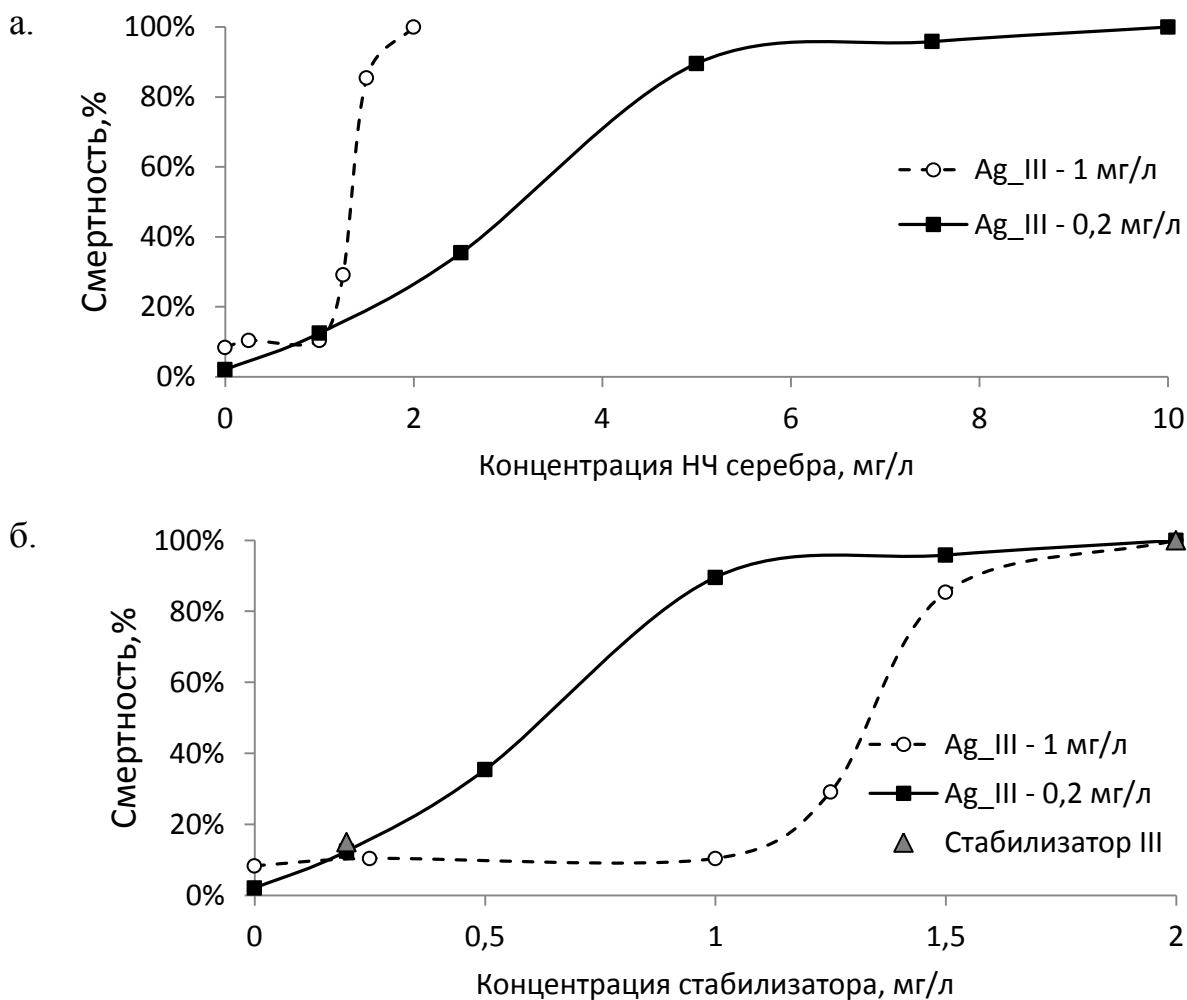


Рисунок 23. Изменение токсичности НЧ серебра, стабилизированных хлоридом полигексаметилен-бигуанидина, в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*, в зависимости от концентраций серебра (а) и стабилизатора (б).

При переводе результатов в единицы концентрации стабилизатора III кривые попадают в один интервал концентраций. Таким образом, результаты приводят к выводу, что определяющим фактором токсичности растворов для эмбрионов рыб в данном случае является наличие стабилизатора. Данные по токсичности для икры стабилизатора III с концентрациями 0,2 и 2 мг/л подтверждают данное предположение.

Следовательно, можно предположить, что экотоксичность растворов наночастиц Ag_{III} обусловлена в большей степени наличием в растворе стабилизирующих веществ. При этом следует отметить, что для некоторых коллоидных растворов были получены противоречивые результаты, т.е. когда для одного раствора токсическое действие можно было объяснить

наличием стабилизатора, а в случае другого раствора стабилизатор не оказывал существенного влияния на рыб, как в случае с НЧ серебра, стабилизированными талловым амфополикарбоксихлицинатом (Ag_V).

Для выявления вклада стабилизатора и НЧ серебра были проанализированы данные по токсичности НЧ серебра и нанокompозита на основе серебра, стабилизированных амфотерным ПАВ - талловым амфополикарбоксихлицинатом.

На Рисунке 24 представлено сравнение данных для разных НМ с одинаковым стабилизатором, приведены зависимости смертность эмбрионов рыб от концентрации НМ и от концентрации стабилизатора в растворе.

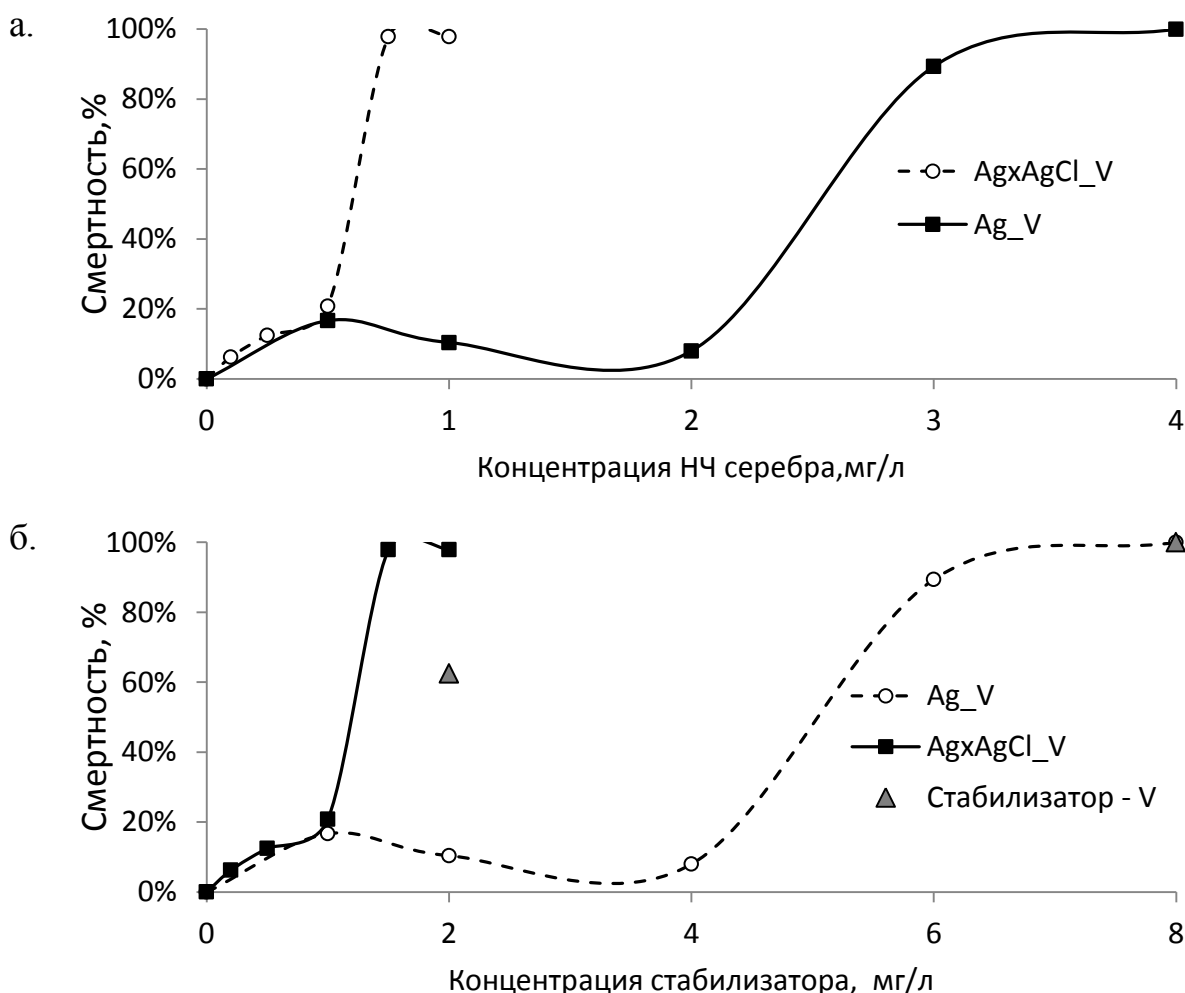


Рисунок 24. Изменение токсичности НЧ серебра разного химического состава (Ag_V и Ag₂Cl_V), стабилизированных талловым амфополикарбоксихлицинатом, в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*, в зависимости от концентраций серебра (а) и стабилизатора (б).

К сожалению, полученные данные не позволяют ответить на вопрос, чем объясняется токсический эффект в случае раствора НМ_V - присутствием НМ или присутствием стабилизатора.

Дополнительно были проведены эксперименты по токсичности самих стабилизаторов. Для концентраций 2 и 8 мг/л стабилизатора таллового амфополикарбоксихлицината смертность рыб составила, соответственно, 62,5% и 100%. Для НЧ серебра с концентрацией стабилизатора 8 мг/л получены те же данные по смертности эмбрионов, тогда как для серебряных НЧ с концентрацией стабилизатора 2 мг/л показатели по смертности эмбрионов отличаются от данных для раствора самого стабилизатора (Таблица 19). Понижение токсичности стабилизатора может быть объяснено взаимодействием стабилизатора с НЧ серебра.

Исходя из объединенных данных по токсичности разных НЧ серебра с талловым амфополикарбоксихлицинатом натрия, можно говорить о достаточно сложном механизме токсического действия растворов НЧ на эмбрионов *Danio rerio*. Вполне вероятно, что имеет место совместное токсическое влияние НЧ и стабилизатора на развитие икры. При этом результаты показывают, что токсичность НЧ серебра в присутствии различных ПАВ существенно ниже, чем у ионов серебра.

Токсичность растворов чистых стабилизаторов была проанализирована в отдельном эксперименте. Суммарные данные по токсичности растворов чистых стабилизаторов и результаты по токсичности растворов НЧ с такой же концентрацией стабилизирующих веществ приведены в Таблице 19.

Несмотря на то, что была выявлена значительная токсичность стабилизирующих веществ, нет причин исключать участие НЧ серебра в механизме токсичности для *Danio rerio*. Стоит отметить, что НЧ могут понижать токсичность стабилизатора, что может быть вызвано прочной адсорбцией стабилизатора на поверхности НЧ серебра.

Таблица 19. Экспериментальные данные по токсичности стабилизирующих веществ

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

Это было показано на примере НЧ серебра, стабилизированных такими веществами, как хлорид бензилдиметил[3-(миристоиламино)-пропил] аммония и талловый амфополи-карбоксихлицинат (Ag_II и Ag_V соответственно).

Основываясь на данных по токсичности стабилизаторов и коллоидных растворов серебра, можно предположить, что имеется комбинированный механизм воздействия НЧ серебра и стабилизирующего вещества на биологические объекты, при наличии в растворе стабилизатора, обладающего своей высокой экотоксичностью. По нашим наблюдениям, могут иметь место три возможных степени влияния стабилизатора на экотоксичность суспензий НЧ серебра: (1) токсичность определяется, главным образом, наличием серебряных НЧ в растворе с неактивным в отношении эмбрионов рыб стабилизатором (Ag_IV), (2) токсичность напрямую зависит от наличия стабилизатора, обладающего высокой экотоксичностью (Ag_III) и (3) имеет место смешанный механизм воздействия на гидробионтов (Ag_V).

В Таблице 20 приведены суммарные результаты определения токсичности НЧ серебра разной формы в присутствии разных стабилизаторов, выраженной параметром LC_{50} .

Таблица 20. Расчеты токсичности НЧ серебра в отношении эмбрионов рыб *Danio rerio*

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

Наночастицы серебра, стабилизированные кокодипропионатом натрия ($LC_{50} = 0,515$ и $LC_{50} = 0,580$ мг/л для растворов с низкой и высокой концентрациями стабилизатора) и сульфэтоксилатом додеканола ($LC_{50} = 0,219$ мг/л) показали наибольшую токсичность, по сравнению с другими НЧ серебра, стабилизированными разными ПАВ. Значение полуметальной концентрации для нанокompозита серебра имеет близкое значение $LC_{50} = 0,563$ мг/л. Частицы Ag_III оказались одними из самых нетоксичных ($LC_{50} = 1,328$ и $LC_{50} = 2,917$ мг/л, для растворов с низкой и высокой концентрациями хлорида полигексаметилен-бигуанидина).

Все исследуемые растворы оказывали существенное токсическое воздействие на тестируемые организмы. При этом токсический эффект растворов НЧ серебра с разными стабилизаторами оказался, как правило, меньше по сравнению с показателями для нитрата серебра. Напротив,

частицы с нейтральными стабилизаторами (смесь поливинилпирролидона и цитрата натрия) оказывали сопоставимый и даже более выраженный эффект на эмбрионов рыб. Для всех растворов наблюдалась зависимость показаний по смертности эмбрионов и скорости выклева из оболочки от концентрации НЧ серебра. Типичными морфологическими отклонениями у выживших особей были сколиоз, укороченное тело, замедленный выход из оболочки и увеличение перикардального пузыря.

При сопоставлении данных с размерными характеристиками НЧ после получения и в экспериментальной среде (Рисунок 25) какой-либо закономерности выявить не удалось. Как отмечалось ранее, размер НЧ имеет определённое значение в экотоксичности, но не может выступать в качестве основной токсикологической характеристики воздействия НЧ на окружающую среду.

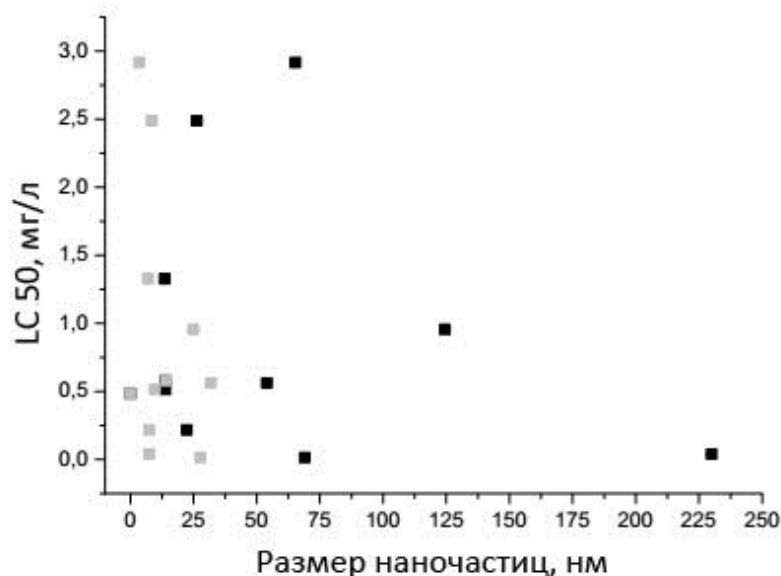


Рисунок 25. Изменение показателя токсичности наночастиц серебра LC_{50} в отношении эмбрионов *Danio rerio* в зависимости от исходного размера наночастиц (■) и их размера в инкубационной среде (□).

Полученные данные позволяют заключить, что токсический эффект коллоидных растворов НЧ на биообъекты зависит от ряда факторов, в

частности, от химического состава самих НЧ и химических свойств стабилизирующего вещества, формы НЧ и концентрации стабилизатора.

3.6. Моделирование токсичности наночастиц с использованием базы данных OCHEM

В рамках настоящего исследования были собраны данные по токсичности разных НЧ (в частности, НЧ металлов и оксидов металлов) в отношении различных биологических видов. Суммарно было отобрано более 1000 данных, представленных в статьях и полученных в собственных исследованиях.

Кроме этого, была собрана информация по характеристикам НЧ, в частности, по размеру, форме НЧ, природе стабилизатора и условиям постановки эксперимента. Данные были внесены в базу данных OCHEM (база данных www.OCHEM.eu). В дальнейшем собранные данные были использованы при разработке QSAR моделей. Было разработано несколько классификационных и регрессионных моделей с использованием входящих в базу данных дескрипторов и физико-химических свойств и характеристик НЧ.

Модели регрессии. При оценке корректности регрессионных моделей используют следующие значения: среднеквадратичное отклонение b^2 , среднее абсолютное отклонение S , квадрат коэффициента корреляции R^2 и межвалидационный коэффициент q^2 . Коэффициенты R^2 и q^2 характеризуют степень отличия рассчитанных значений от экспериментальных величин. Чем ближе значение R^2 к единице, тем лучше модель описывает экспериментальные данные. В соответствии с общими рекомендациями QSAR модели, для которых с $q^2 > 0,5$, относят к моделям с приемлемой прогностической способностью [155]. Система OCHEM позволяет рассчитывать перечисленные выше статистические параметры для обучающей и контрольной выборок.

Нами были разработаны пять моделей регрессии с применением метода связанных нейронных сетей (ASNN) для различных наборов данных и с разным количеством дескрипторов [156]. В Таблице 21 приведены статистические параметры лучших регрессионных моделей QSAR. Точность индивидуальных моделей для контрольной выборки рассматривали в качестве критерия прогностической способности моделей. Коэффициенты q^2 для обучаемых наборов находятся в пределах 0,69-0,79. Значение q^2 для тестовых выборок варьируется от 0,70 до 0,79. Третья модель была разработана с использованием только свойств НЧ и их физико-химических характеристик без подключения дескрипторов. Для построения модели были взяты следующие свойства НЧ: химический состав, средний размер, свойства поверхности частиц (заряд, тип стабилизатора, удельная площадь поверхности) и форма НЧ. Остальные модели были получены на базе стандартных расчетных дескрипторов и свойств НЧ.

Также была воспроизведена ранее опубликованная модель [106]. В рассматриваемой модели квантово-механический расчет объединен с методами QSAR. При этом величина EC_{50} рассчитывается через энтальпию образования положительно заряженного оксида. Мы использовали квантово-механические данные как дескрипторы для построения моделей QSAR. В данном случае нас интересовала возможность использования базы данных OCHEM для построения моделей токсичности НЧ и сравнение результатов.

Исходные и полученные при построении методом ASNN (Associative Neural Network - ассоциативных «нейронных сетей») параметры равны, соответственно, $R^2 = 0,85$, $q^2 = 0,77$ и $R^2 = 0,87$, $q^2 = 0,8$ [106]. В нашем случае параметры модели R^2 и q^2 несколько лучше, что свидетельствует о большем совпадении экспериментальных и расчетных значений. Расчеты показали, что полученные нами результаты вполне сопоставимы с опубликованными данными.

Таблица 21. Статистические коэффициенты для разных наборов данных (расчеты проведены по методу ASNN)

№	Набор данных	Категория	Количество наночастиц	Количество дескрипторов	R^2	q^2	σ^2	S
1	НД 1(LC ₅₀)	Обучающая выборка	234	32	0,71±0,04	0,71 ±0,04	1,02±0,07	0,75±0,04
		Контрольная выборка	101		0,74±0,05	0,74±0,05	0,98±0,09	0,70±0,07
2	НД 1.1 (MeO)	Обучающая выборка	76	24	0,69±0,06	0,69±0,06	1,09±0,09	0,87±0,07
		Контрольная выборка	25		0,69±0,06	0,78±0,07	0,90±0,09	0,70±0,10
3	НД 1.2 (Me)	Обучающая выборка	132	9	0,79±0,04	0,79±0,04	0,85±0,07	0,64±0,05
		Контрольная выборка	56		0,78±0,06	0,76±0,06	0,80±0,10	0,56±0,08
4	НД 2 (EC ₅₀)	Обучающая выборка	115	44	0,79±0,03	0,79±0,03	0,65±0,04	0,51 ±0,04
		Контрольная выборка	49		0,70±0,10	0,70±0,10	0,90±0,10	0,64±0,09
5	НД 5 (LC ₅₀ (Ag НЧ))	Обучающая выборка	60	6	0,74±0,05	0,74±0,05	0,68±0,07	0,50 ±0,06
		Контрольная выборка	15		0,79±0,08	0,70±0,20	1,00±0,20	0,80±0,10

σ^2 - среднеквадратичное отклонение; S - среднее абсолютное отклонение.

Классификационные модели. Программа ОСНЕМ использует среднюю достоверную классификационную величину, выраженную в процентах, в качестве определителя по категориям. Средняя классификационная величина дополняется матрицей беспорядка, которая отображает количество надежно идентифицированных веществ для каждого класса, а также число ошибочных решений, когда соединения относят в неверную категорию.

Было разработано 11 моделей QSAR, разграничивающих НЧ на низко- и высокотоксичные категории [156]. Сравнение моделей приведено в Таблице 22. Лучшие результаты были получены методом WEKA-RF. Модели с первой по третью были разработаны при использовании только физико-химических свойств и характеристик НЧ. В качестве дескрипторов были использованы следующие данные: химический состав НЧ, средний размер НЧ, свойства поверхности, кристаллическая структура, форма НЧ и условия эксперимента. Точность совпадения для обучающих выборок находилась в интервале 76-100%, а для контрольных выборок точность варьировалась в пределах 78-100%.

Следует отметить, что при разработке некоторых моделей использовались только свойства НЧ и условия эксперимента. Полученные в ходе моделирования результаты позволили выделить те свойства НЧ, которые определяют их токсическое воздействие на био-объекты - это химический состав НЧ, размерные характеристики (средний размер НЧ и агрегатов), форма НЧ и свойства поверхности (заряд, площадь поверхности), тип стабилизатора. Размер НЧ, их форма и тип стабилизатора использовались при построении всех моделей.

Таблица 22. Сравнение классификационных моделей QSAR, построенных разными методами машинного обучения

№	Набор данных	Количество наночастиц	Количество дескрипторов	Метод расчета	Коэффициент корреляции R ²		Надежность, %
					Низкотоксичные	Высокотоксичные	
Набор данных №1(LC ₅₀)							
1	Обучающая выборка	193	11	ASNN	0,90	0,90	90,0±2,0
	Контрольная выборка	83			0,80	0,78	80,0±4,0
2	Обучающая выборка	193	11	WEKA-RF	0,97	0,96	97,0±1,0
	Контрольная выборка	83			0,79	0,78	78,0±5,0
3	Обучающая выборка	193	12	kNN	0,80	0,78	88,0±3,0
	Контрольная выборка	83			0,78	0,79	81,0±5,0
Набор данных №2(EC ₅₀)							
4	Обучающая выборка	141	43	ASNN	0,94	0,95	94,0±2,0
	Контрольная выборка	59			0,88	0,82	85,0±5,0
5	Обучающая выборка	141	43	WEKA-RF	1,00	0,82	99,0±0,8
	Контрольная выборка	59			0,82	0,99	83,0±5,0
6	Обучающая выборка	141	43	kNN	0,87	0,88	88,0±3,0
	Контрольная выборка	59			0,84	0,79	81,0±5,0
Набор данных №3(MIC)							
7	Обучающая выборка	66	8	ASNN	0,91	0,77	82,0±5,0
	Контрольная выборка	28			0,92	0,60	78,0±7,0
8	Обучающая выборка	66	7	WEKA-RF	0,97	0,97	97,0±2,0
	Контрольная выборка	28			0,97	0,70	82,0±7,0
9	Обучающая выборка	66	8	kNN	0,69	0,83	76,0±5,0
	Контрольная выборка	28			0,94	0,80	89,0±7,0
Набор данных №4(LD ₅₀)							
10	Обучающая выборка	16	24	ASNN	1,00	1,00	100±0,0
	Контрольная выборка	7			1,00	0,80	90,0±10,0
11	Обучающая выборка	16	14	WEKA-RF	1,00	1,00	100±0,0
	Контрольная выборка						

Представленные модели демонстрируют возможность использования физико-химических свойств и характеристик НЧ для прогнозирования токсичности НЧ. Сравнение данных Таблицы 21 с показателями, представленными в Таблице 22, приводит к выводам, что лучшие результаты дает прогнозирование токсических свойств НЧ с помощью классификационных моделей, чем модели регрессии. Следовательно, модели классификации имеют преимущество при оценке токсичности новых НЧ.

Данное заключение подтвердилось при проверке прогностической способности полученных моделей для изученных экспериментально серебряных НЧ (Таблица 23).

Таблица 23. Экспериментальные и расчетные данные для классификационных моделей

Наночастицы	Эксперимент	kNN	WEKA-RF	ASNN
Ag_I	BT	BT	BT	HT
Ag_II	BT	BT	BT	HT
Ag_III (1 мг/л)	BT	BT	BT	HT
Ag_III (0,2 мг/л)	HT	BT	BT	HT
Ag_IV (12 мг/л)	BT	BT	BT	HT
Ag_IV (5 мг/л)	BT	BT	BT	HT
Ag _x AgCl_V	BT	BT	BT	HT
Ag_V	HT	BT	BT	HT
Ag_2.4 (пластины)	BT	BT	BT	BT
Ag_3.1 (сферы)	BT	BT	BT	HT

Классификационные модели показали большую надежность в построении прогнозов по токсичности исследованных НЧ. Лучшие результаты были получены для моделей WEKA-RF и kNN, тогда как для ASNN значение имели противоположные категории.

Для регрессионных моделей были получены близкие показатели токсичности, но данные модели не позволяют получить точное совпадение значений (Таблица 24).

Таблица 24. Экспериментальные и расчетные данные для регрессионной модели

Наночастицы	LC ₅₀ , мг/л		95% доверительный интервал
	Эксперимент	Расчет	
Ag_I	0,219	0,905	0,216 – 0,302
Ag_II	0,956	1,140	0,932 – 0,981
Ag_III (1 мг/л)	1,328	1,050	1,248 – 1,414
Ag_III (0,2 мг/л)	2,917	1,060	2,763 – 3,080
Ag_IV (12 мг/л)	0,515	0,809	0,351 – 0,817
Ag_IV (5 мг/л)	0,580	0,909	0,370 – 0,909
Ag _x AgCl_V	0,563	0,862	0,492 – 0,644
Ag_V	2,488	0,977	2,028 – 3,052
Ag_2.4 (пластины)	0,017	0,423	0,015 - 0,018
Ag_3.1 (сферы)	0,041	0,850	0,036 - 0,045

Ограничением представленных моделей, как и для всех моделей QSAR в целом, является то, что модели хорошо работают для выборок обучения и проверки, но в тоже время могут давать ложные результаты для других сторонних данных.

Могут появляться и дополнительные ошибки, связанные с тем, что биологические данные, используемые в качестве обучающей выборки, получены из различных источников и могут содержать значительные экспериментальные расхождения. Другим ограничением предлагаемых моделей является отсутствие данных по некоторым обязательным условиям для вновь протестированных НЧ, что также может приводить к получению неверных предсказаний по токсичности НЧ.

4. Заключение

Разработанные оригинальные методики с использованием планарий и моллюсков позволяют исследовать токсические свойства НЧ, особенности их распространения и накопления в различных органах животных. Проведенные исследования экотоксичности коммерческих НЧ серебра Agbion в отношении пяти видов гидробионтов показали, что все биологические объекты оказались чувствительны к указанному препарату. Наибольшей чувствительностью обладали рачки *Daphnia magna* и рыбы *Danio rerio* на эмбриональной стадии развития. Полученные результаты по токсичности стабилизирующей добавки препарата Agbion (диоктилсульфосукцината натрия) дают основания предполагать, что имеет место существенное влияние стабилизатора на токсичность препарата Agbion для всех тест-объектов.

Проведенные исследования свойств и физико-химические характеристик НЧ показывают, что НЧ серебра существенно различаются как по физико-химическим показателям, в частности ζ – потенциалом, так и морфологией, размером и своими токсическим свойствам в отношении эмбрионов рыб. Экспериментальные данные позволили обнаружить существенное влияние формы НЧ серебра на их токсические свойства по сравнению с влиянием их размера. Как показывают результаты исследований, нанопластины серебра проявляют более высокую биологическую активность в отношении эмбрионов рыб, чем сферические НЧ. Так, средние показатели LC_{50} для плоских и сферических НЧ серебра составили, соответственно, 0,016 мг/л и 0,041 мг/л, причем обе формы серебряных НЧ проявляют большую токсичность по сравнению с ионами серебра. Более высокую активность нанопластин Ag можно объяснить, скорее всего, сравнительно высокой концентрацией координационно-ненасыщенных атомов серебра, расположенных на ребрах и вершинах нанопластин, и которые могут являться центрами активации свободных радикалов и образования активных форм кислорода, способные оказывать

высокое токсическое действие в отношении биологических тканей, а также нарушать биологические процессы, протекающие в живых организмах.

Основываясь на данных по токсичности стабилизаторов и коллоидных растворов серебра, есть основания предполагать, что при наличии в растворе, содержащем наночастицы, органического стабилизатора, обладающего токсическими свойствами, может происходить комбинированное токсическое воздействие на биологический объект, как от НЧ серебра, так и от стабилизирующего вещества. Результаты токсических тестов для суспензий НЧ серебра и растворов стабилизаторов приводят к выводу, что возможны три варианта влияния стабилизатора на токсичность НЧ серебра: (1) - токсичность определяется наличием соединений серебра в растворе с неактивным стабилизатором (Ag_IV), (2) - токсичность зависит от наличия стабилизатора (Ag_III) и (3) - имеет место смешанное воздействие НЧ серебра и стабилизатора (Ag_V).

Полученные в ходе экспериментов данные по токсичности НЧ для гидробионтов дают основания предполагать, что токсический эффект суспензий НЧ серебра зависит, главным образом, от химического состава НЧ, ζ -потенциала поверхности, формы НЧ, природы стабилизирующего вещества и концентрации стабилизатора. При сопоставлении данных, связанных с размерными характеристиками НЧ серебра после получения НЧ и в экспериментальной среде, какой-либо зависимости выявить не удалось.

Исходя из статистических параметров разработанных математических моделей токсичности НМ, можно заключить, что использование свойств и физико-химических характеристик НЧ и методов QSAR позволяет достаточно успешно описывать токсические свойства НЧ. Результаты внутренней и внешней проверки построенных моделей QSAR показали, что они обладают не только хорошей надежностью, но также стабильностью и прогностической способностью.

Сравнение статистических параметров рассмотренных моделей, приводит к выводу, что классификационные модели дают лучшие

результаты, чем модели регрессии и их применение имеет определенное преимущество при оценке токсичности новых НЧ.

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

5. ВЫВОДЫ

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

2. Впервые экспериментально обнаружена зависимость токсических свойств НЧ серебра от их формы. Показано, что плоские наночастицы серебра проявляют более высокую биологическую активность, чем сферические наночастицы, даже меньшего размера в отношении эмбрионов рыб. Средние значения полуметальной концентрации LC50 в этих опытах составили для плоских и сферических наночастиц 0,016 и 0,041 мг/л, соответственно.

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

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

5. Показана возможность использования физико-химических и других характеристик НЧ, таких, как размер и форма НЧ серебра, ζ -

потенциал поверхности наночастиц, а так же природа стабилизатора для описания токсической активности суспензий серебра и построения математических моделей, адекватно описывающих их биологическую активность.

Список сокращений

- ASNN (associative neural network) – метод ассоциативных «нейронных сетей»
- BPNN (back-propagation neural network) - алгоритм обратного воспроизведения
- DLS (dynamic light scattering) – метод динамического светорассеяния
- EC_n - концентрация вещества, при которой исследуемое свойство уменьшается на n% от начального значения
- kNN (k-nearest neighbors) - Метод ближайших k соседей
- LC₅₀ – полуметальная концентрация вещества, при которой гибнет 50% популяции
- LC_n – летальная концентрация вещества, при которой гибнет n% популяции в заданный временной интервал
- LD_n - летальная доза вещества, при которой гибнет n% популяции в заданный временной интервал
- LOEC (lowest-observed-effect concentration) – минимальная концентрация вещества вызывающая токсический эффект для выбранного организма
- MBC (minimum bactericidal concentration) - минимальная концентрация антибактериального вещества, необходимая для полной гибели конкретной бактерии
- MIC (minimum inhibitory concentration) – минимальная ингибирующая концентрации
- NOEC (no observed effect concentration) – наибольшая концентрация вещества, не вызывающая токсического действия у тестируемого организма
- NTA (nanoparticle tracking analysis) – анализ траектории наночастиц
- QSAR (quantitative structure activity relationship) – количественная взаимосвязь структуры вещества с его свойством или активностью
- SMILES (simplified molecular input line entry specification) – упрощенного представления молекул в строке ввода

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

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

АСМ - атомно-силовая микроскопия

Гидробионты – водные организмы

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

МТК - минимальная токсическая концентрация

НД – набор данных

НМ – наноматериалы

НЧ – наночастицы

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия

Список литературы

- 1 Nordberg, G. Handbook on the toxicology of metals / G. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg. - Academic Press, 2014. - 1024 p.
- 2 Ivask, A. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review / A. Ivask, K. Juganson, O. Bondarenko, M. Mortimer, V. Aruoja, K. Kasemets, A. Kahru // *Nanotoxicology*. – 2014. –V. 8. – P. 57–71.
- 3 Schrand, A. M. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment / A. M. Schrand, M. F. Rahman, S. M. Hussain, J. J. Schlager, D. A. Smith, A. F. Syed // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2010. – V. 2 № 5. – P. 544–568.
- 4 Gajewicz, A. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: application of computational approaches / A. Gajewicz, B. Rasulev, T. C. Dinadayalane, P. Urbaszek, T. Puzyn, D. Leszczynska, J. Leszczynski // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2012. – V. 64 № 15. – P. 1663–1693.
- 5 Oberdörster, G. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective / G. Oberdörster, V. Stone, K. Donaldson // *Nanotoxicology*. 2007. -V. 1 № 1. - P. 2–25.
- 6 Moore, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? / M. N. Moore // *Environment International*. – 2006. – V. 32 №8. – P. 967–976.
- 7 Kahru, A. Mapping the dawn of nanoecotoxicological research /A. Kahr, A. Ivask // *Accounts of Chemical Research*. – 2013. - V. 46 № 3. – P. 823–833.
- 8 Bondarenko, O. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review /O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru // *Archives of Toxicology*. – 2013. - V. 87 № 7. - P. 1181–1200.

-
- 9 Chatterjee, R. The challenge of regulating nanomaterials / R. Chatterjee // *Environmental Science & Technology*. – 2008. – V. 42 № 2. – P. 339–343.
- 10 Vance, M. E. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory / M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski, M. S. Hull // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. – 2015. – V. 6 №1. – P. 1769–1780.
- 11 Nel, A. Toxic potential of materials at the nanolevel / A. Nel., T. Xia, L. Mädler, N. Li // *Science*. – 2006. – V. 311. – P. 622–627.
- 12 Maynard, A. D. Safe handling of nanotechnology / A. D. Maynard, R.J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdorster, M.A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S.S. Tinkle, L. Tran, N.J. Walker, D.B. Warheit // *Nature*. – 2006. – V. 444. – P. 267-269.
- 13 Senjen, R. Nanotechnologies in the 21st century: nanomaterials - health and environmental concerns [Электронный ресурс] / R. Senjen, J. Hontelez // *EEB Nanotechnology*. – 2009. - № 2. 17 P. Режим доступа: <Http://Www.Eeb.Org/EEB/?Linkservid=540E4DA2-D449-3BEB-90855B4AE64E8CE6>
- 14 Savolainen, K. Nanosafety in Europe 2015-2025: towards safe and sustainable nanomaterials and nanotechnology innovations [Электронный ресурс] / K. Savolaine, U. Backman, D. Brouwer, B. Fadeel, T. Fernandes, T. Kuhlbusch, R. Landsiedel, I. Lynch, L. Pylkkänen // *Finnish Institute Of Occupational Health, Helsinki*. - 2013. Режим доступа: <http://www.nanosafetycluster.eu/news/83/66/Nanosafety-in-Europe-2015-2025.html>
- 15 Henglein, A. Mechanism of reactions on colloidal microelectrodes and size quantization effects / A. Henglein // *Topics in Current Chemistry*. – 1988. – V. 143. – P. 113–180.

-
- 16 Lakbub, J. Electrochemical behaviors of single gold nanoparticles / J. Lakbub, A. Pouliwe, A. Kamasah, C. Yang, P. Sun // *Electroanalysis*. – 2011. – V. 23 №10. – P. 2270–2274.
- 17 Ivanova, O. S.,. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles / O. S. Ivanova, F. P Zamborini // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – V. 132 №1. – P. 70–72.
- 18 Zhang, W. Nanoparticle aggregation: principles and modeling / W. Zhang // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – V. 811. – P. 19–43.
- 19 Губин, С.П., Наночастицы благородных металлов и материалы на их основе / С.П. Губин, Г.Ю. Юрков, Н.А Катаева // Москва: ИОНХ РАН. - 2006. - С. 63
- 20 Wang, N. Room temperature creep behavior of nanocrystalline nickel produced by an electrodeposition technique / N. Wang, Z. Wang, K. T. Aust, U. Erb // *Materials Science and Engineering: A*. – 1997. – V. 237№2. – P. 150–158.
- 21 Wang, Y. High tensile ductility in a nanostructured metal / Y. Wang, M. Chen, F. Zhou, E. Ma // *Nature*. – 2002. – V. 419 №6910. – P. 912–915.
- 22 Xing, H. L. Recent development in the mechanics of superplasticity and its applications / H. L. Xing, C. W. Wang, K. F. Zhang, Z. R. Wang.// *Journal of Materials Processing Technology*. – 2004. – V. 151 №1–3. – P. 196–202.
- 23 Ju-Nam, Y. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications / Y. Ju-Nam, J. R. Lead // *Science of The Total Environment*. – 2008. – V. 400 №1. – P. 396–414.
- 24 Moghimi-Rad, J., Shape-controlled synthesis of silver particles by surfactant self-assembly under ultrasound radiation / J. Moghimi-Rad, T. D. Isfahani, I. Hadi, S. Ghalamdaran, J. Sabbaghzadeh, M. Sharif // *Applied Nanoscience*. – 2011. – V. 1 №1. – P. 27–35.
- 25 Song, Y. Aqueous phase Ag nanoparticles with controlled shapes fabricated by a modified nanosphere lithography and their optical properties / Y. Song., H.

-
- E. Elsayed-Ali // *Applied Surface Science*. – 2010. – V. 256 №20. – P. 5961–5967.
- 26 Daniel, M.-C. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology / M.-C. Daniel, D. Astruc // *Chemical Reviews*. – 2003. – V. 104. – P. 293-346.
- 27 Svergun, D.I., Small-angle X-Ray scattering study of platinum-containing hydrogel/surfactant complexes / D.I. Svergun, E.V. Shtykova, M.B. Kozin, V.V. Volkova, A.T. Dembo, E.V. Shtykova, L.M. Bronstein, O.A. Platonova, A.N. Yakunin, P.M. Valetsky, A.R. Khokhlov // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2000. - V. 104. – P. 5242-5250.
- 28 Помогайло, А.Д. // *Наночастицы металлов в полимерах* / А.Д. Помогайло, А.С.Розенберг, И.Е. Уфлянд // М.: Химия. – 2000. - С. 672.
- 29 Balan, L. Silver nanoparticles: new synthesis, characterization and photophysical properties / L. Balan, J.-P. Malval, R. Schneider, D. Burget // *Materials Chemistry and Physics*. – 2007. – V. 104 №2–3. – P. 417–421.
- 30 Huang, T. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy / T. Huang, X.-H. Nancy // *Journal of Materials Chemistry*. – 2010. – V. 20 №44. – P. 9867–9876.
- 31 Pileni, M. P. Nanosized particles made in colloidal assemblies / M. P. Pileni // *Langmuir*. – 1997. - V. 13. – P. 3266-3276.
- 32 Filipe, V. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates / V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot // *Pharmaceutical Research*. – 2010. – V. 27№5. – P. 796–810.
- 33 ПНДФ 14.1:2:3:4.10-05 Методика определения индекса токсичности нанопорошков, нанопокрований, отходов и осадков сточных вод, содержащих наночастицы, по изменению оптической плотности тест-культуры

-
- водоросли хлорелла (*Chlorella Vulgaris* Beijer). Федеральная служба по надзору в сфере природопользования. – М. - 2012. – 43 с.
- 34 МР 1.2.2566–09 Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. М. - 2010. – 70 с.
- 35 Stine, K. Principles of toxicology / K. Stine, T. M. Brown. – CRC Press, 2015. – 455p.
- 36 Song, L. Smart nanotoxicity testing for biodiversity conservation / L. Song, M. G. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg, G. R. De Snoo // Environmental Science & Technology. – 2010. – V. 45№15. – P. 6229–6230.
- 37 Singh, M. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles / M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I.S. Gambhir // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. – 2008. – V. 3 №3. – P. 115 - 122.
- 38 Morones, J. R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J.R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, M. J. Yacaman// Nanotechnology. – 2005. – V. 16 №10. – P. 2346–2353
- 39 Lok, C.-N. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles / C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, C.-M. Che, // Journal of Proteome Research. – 2006. – V. 5 №4. – P. 916–924.
- 40 Thomas, C. R. Nanomaterials in the environment: from materials to high-throughput screening to organisms / C.R. Thomas, S. George, A. M. Horst, Z. Ji, R. J. Miller, J. R., Peralta-Videa, J. I. Zink // ACS Nano. – 2011. – V. 5. – P. 13-20
- 41 Nel, A. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening / A. Nel, T. Xia, H. Meng, X. Wang, S. Lin, Z. Ji, H. Zhang // Accounts of Chemical Research. – 2013. – V. 46. – P. 607–621.

-
- 42 Nel, A. E. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface/ A. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, M. Thompson // *Nature Materials*. – 2009. – V. 8. – P. 543–557.
- 43 Hermsen, S. A. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies / S. A. Hermsen, E.-J. van den Brandhof, L. T. van der Ven, A. H. Piersma// *Toxicology in Vitro*. – 2011. – V. 25 №3. – P. 745–753.
- 44 Kittler, S. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions / S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Epple // *Chemistry of Materials*. – 2010. – V. 22№16. – P. 4548–4554.
- 45 Khlebtsov, B. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters / B. Khlebtsov, V. Zharov, A. Melnikov, V. Tuchin, N. Khlebtsov // *Nanotechnology*. – 2006. – V. 17№20. – P. 5167–5179.
- 46 Wijnhoven, S. W. P. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment / S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, R. E. Geertsma // *Nanotoxicology*. – 2009. – V. 3№2. – P. 109–138.
- 47 Navarro, E. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* / E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, R. Behra // *Environmental Science & Technology*. – 2008. – V. 42. – P. 8959–8964.
- 48 Bilberg, K. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*) / K. Bilberg, M. B. Hovgaard, F. Besenbacher, E. Baatrup // *Journal of Toxicology*. – 2012. – V. 2012. – P. 293784.

-
- 49 Beer, C. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? / C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland, H. Autrup // *Toxicology Letters*. – 2012. – V. 208. – P. 286–292.
- 50 Wautelet, P. Spin exchange interaction through phenylene-ethynylene bridge in diradicals based on iminonitroxide and nitronylnitroxide radical derivatives / P. Wautelet, J. le Moigne, V. Videva, P. Turek // *Journal of Organic Chemistry*. – 2003. – V. 68. – P. 8025-8036
- 51 Alivisatos, A. P. Organization of “nanocrystal molecules” using DNA / A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz // *Nature*. – 1996. – V. 382. – P. 609–611.
- 52 Golovina, N. B. Toxicity of metal nanoparticles with a focus on silver / N. B. Golovina, L. M. Kustov // *Mendeleev Communications*. – 2013. – V. 23, № 2. – P.59-65
- 53 Zhu, M. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate / M. Zhu, G. Nie, H. Meng, T. Xia, A. Nel, Y. Zhao // *Accounts of Chemical Research*. - 2013. – V. 46 № 3. – P. 622–31.
- 54 Bar-Ilan, O. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos / O. Bar-Ilan, R. M. Albrecht, V. E. Fako, D. Y. Furgeson // *Small*. – 2009. – V. 5№16. – P. 1897–1910.
- 55 Jiang, W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent / W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – V. 3№3. P. 145–150.
- 56 Lee, K. J. In vivo quantitative study of sized-dependent transport and toxicity of single silver nanoparticles using zebrafish embryos / K. J. Lee, L. M. Browning, P. D. Nallathamby, T. Desai, P. K. Cherukuri, X.-H. N. Xu// *Chemical Research in Toxicology*. – 2012. – V. 25№5. – P. 1029–1046.
- 57 Tenzer, S. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis

-
- / S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rezik, R. H. Stauber // *ACS Nano*. – 2011. – V. 5№9. – P. 7155–7167.
- 58 Ispas, C. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish / C. Ispas, D. Andreescu, A. Patel, D. V. Goia, S. Andreescu, K. N. Wallace // *Environmental Science & Technology*. – 2009. – V. 43№16. – P. 6349–6356
- 59 Ivask, A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro / A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, A. Kahru // *PloS One*. – 2014. – V. 9№7. – P. e102108.
- 60 Tsoli, M. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters / M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, G. Schmid // *Small*. – 2005. – V. 1№8–9. – P. 841–844.
- 61 Klaine, S. J. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects / S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, J. R. Lead // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2009. – V. 27№9. – P. 1825.
- 62 Schneider, T. Relevance of aerosol dynamics and dustiness for personal exposure to manufactured nanoparticles / T. Schneider, K. A. Jensen // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2009. – V. 11№7. – P. 1637–1650.
- 63 Garner, K. L. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies / K. L. Carner, A. A. Keller // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2014. – V. 16№8. – P. 2503.
- 64 Batley, G. E. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments / G. E. Batley, J. K. Kirby, M. J. McLaughlin // *Accounts of Chemical Research*. – 2013. – V. 46№3. – P. 854–862.
- 65 Stahlmecke, B. Investigation of airborne nanopowder agglomerate stability in an orifice under various differential pressure conditions / B. Stahlmecke, S. Wagener, C. Asbach, H. Kaminski, H. Fissan, T. A. J. Kuhlbusch // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2009. – V. 11№7. – P. 1625–1635.

-
- 66 Prathna, T. C. Studies on aggregation behavior of silver nanoparticles in aqueous matrices: effect of surface functionalization and matrix composition / T. C. Prathna, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, A. Mukherjee // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2011. – V. 390 № 1–3. – P. 216–224.
- 67 Zhu, X. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) / X. Zhu, J. Wang, X. Zhang, Y. Chang, Y. Chen // *Nanotechnology*. – 2009. – V. 20. – P. 195103.
- 68 Albanese, A. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity / A. Albanese, W. C. W. Chan // *ACS Nano*. – 2011. – V. 5 №7. – P. 5478–5489.
- 69 Gilbert, B. The effects of nanoparticle aggregation processes on aggregate structure and metal uptake / B. Gilbert, R. K. Ono, K. A. Ching, C. S. Kim // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2009. – V. 339 №2. – P. 285–295.
- 70 Lin, D. Fate and transport of engineered nanomaterials in the environment / D. Lin, X. Tian, F. Wu, B. Xing // *Journal of Environmental Quality*. – 2010. – V. 39 №6. – P. 1896–1908.
- 71 George, S. Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos / S. George, S. Lin, Z. Ji, C. R. Thomas, L. Li, M. Mecklenburg, A. E. Nel // *ACS Nano*. – 2012. – V. 6 №5. – P. 3745–3759.
- 72 Chithrani, B. D. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes / B. D. Chithrani, W.C. Chan // *Nano Letter*. – 2007. – V. 7. – P. 1542-1550
- 73 Lee, J. H. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells / J. Lee, J. E. Ju, B. I. Kim, P. J. Pak, E.-K. Choi, H.-S. Lee, N. Chung // *Environmental Toxicology and Chemistry* / SETAC. – 2014. – V. 33 №12. - P. 2759–2766.

-
- 74 Dobrovolskaia, M. A. Immunological properties of engineered nanomaterials. / M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – V. 2 № 8. – P. 469–478.
- 75 Ajitha, B. Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor / B. Ajitha Kumar, Y. A. Reddy, P. S. Reddy, H.-J. Jeon, C. W. Ahn, J. Prikulis, A. Ganguly // *RSC Advances*. – 2016. – V. 6№42. – P. 36171–36179.
- 76 Monteiro-Riviere, N. A. Nanotoxicology : characterization, dosing and health effects / N. A. Monteiro-Riviere, C. L. Tran. - New York: Informa Healthcare, 2007. – 434 p.
- 77 Bae, E.-J. Effect of chemical stabilizers in silver nanoparticle suspensions on nanotoxicity / E.-J. Bae, H.-J. Park, J.-S. Park, J.-Y. Yoon, Y.-H. Kim, K.-H. Choi, J.-H. Yi// *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2011. – V. 32 № 2. – P. 613–619.
- 78 Крутяков, Ю.А. Синтез, люминесцентные и антибактериальные свойства наночастиц серебра: автореф. дис.... канд. хим. наук: 02.00.11 / Крутяков Юрий Андреевич. – М., 2008. -26 с.
- 79 Zhu, X. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage / X. Zhu, L. Zhu, Z. Duan, R. Qi, Y. Li, Y. Lang // *Journal of Environmental Science and Health. Part A*. – 2008. – V. 43 №3 .- P. 278–284.
- 80 George, S. Role of Fe doping in tuning the band gap of TiO_2 for the photo-oxidation-induced cytotoxicity paradigm / S. George, S. Pokhrel, Z. Ji, B. L. Henderson, T. Xia, L. Li, L. Mädler // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – V. 133 №29. – P. 11270–11278.
- 81 George, S. Use of a high-throughput screening approach coupled with in vivo zebrafish embryo screening to develop hazard ranking for engineered

-
- nanomaterials / S. George, T. Xia, R. Rallo, Y. Zhao, Z. Ji, S. Lin, A. E. Nel // ACS Nano. – 2011. – V. 5 №3. – P. 1805–1817.
- 82 Oh, W.-K. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality / W.-K. Oh, S. Kim, M. Choi, C. Kim, Y. S. Jeong, B.-R. Cho, J. Jang // ACS Nano. – 2010. – V. 4№9. – P. 5301–5313.
- 83 J. Leszczynski. Towards efficient designing of safe nanomaterials / J. Leszczynski, T. Puzyn, H. Kroto. - Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011, - 378 p.
- 84 Fourches, D. Exploring quantitative nanostructure-activity relationships (QNAR) modeling as a tool for predicting biological effects of manufactured nanoparticles / D. Fourches, D. Pu, A. Tropsha // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2011. – V. 14№3. – P. 217–225.
- 85 Berhanu D. Nanotoxicity: are we confident for modelling? – An experimentalist's point of view / D. Berhanu, E. Valsami-Jones, J. Leszczynski, T. Puzyn. - Cambridge: Royal Society of Chemistry. – 2012. – P. 54-69.
- 86 Toropova, A. P. Optimal descriptor as a translator of eclectic data into prediction of cytotoxicity for metal oxide nanoparticles under different conditions / A.P. Toropova, A. A. Toropov, R. Rallo, D. Leszczynska, J. Leszczynski // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2015. – V. 112. – P. 39–45.
- 87 Polshettiwar, V. Green chemistry by nano-catalysis / V. Polshettiwar, R. S. Varma, D. J. Cole-Hamilton, R. T. Baker, W. Tumas, C. Coperet, G. A. Somorjai // Green Chemistry. – 2010. – V. 12№5. – P. 743-754.
- 88 Oberdörster, G. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy / G. Oberdörster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-

-
- Riviere, D. Warheit, H. Yang // *Particle and Fibre Toxicology*. -2005. – V. 6 № 2. – P. 8.
- 89 Pavan, M. Review of QSAR models for ready biodegradation / M. Pavan, A.P. Worth. - Ispra, Italy: European Commission, Joint Research Centre. – 2006, - 78 p.
- 90 Chen, G. Comparative study of biodegradability prediction of chemicals using decision trees, functional trees, and logistic regression / G. Chen, X. Li, J. Chen, Y.-N. Zhang, W. J. G. M. Peijnenburg // *Environmental Toxicology and Chemistry* / SETAC. – 2014. – V. 33№12. – P. 2688–2693.
- 91 Epa, V. C. Modeling biological activities of nanoparticles / V. C. Epa, F. R. Burden, C. Tassa, R. Weissleder, S. Shaw, D. A. Winkler // *Nano Letters*. – 2012. – V. 12№11. – P. 5808–5812.
- 92 Ehret, J. The application of QSAR approaches to nanoparticles / J. Ehret, M. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg // *Alternatives to Laboratory Animals* : ATLA. – 2014. – V. 42№1. – P. 43–50.
- 93 Gajewicz, A. Towards understanding mechanisms governing cytotoxicity of metal oxides nanoparticles: hints from nano-QSAR studies / A. Gajewicz, N. Schaeublin, B. Rasulev, S. Hussain, D. Leszczynska, T. Puzyn, J. Leszczynski // *Nanotoxicology*. – 2015. – V. 9№3. – P. 313–325.
- 94 Ghorbanzadeh, M. Modeling the cellular uptake of magnetofluorescent nanoparticles in pancreatic cancer cells: a quantitative structure activity relationship study /M. Ghorbanzadeh, M. H. Fatemi, M. Karimpour // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2012. – V. 51№32. – P. 10712–10718.
- 95 Fourches, D. Quantitative Nanostructure–Activity Relationship Modeling / D. Fourches, D. Pu, C. Tassa, R. Weissleder, S. Y. Shaw, R. J. Mumper, A. Tropsha // *ACS Nano*. – 2010. – V. 4№10. – P. 5703–5712.
- 96 Kar, S. Nano-quantitative structure-activity relationship modeling using easily computable and interpretable descriptors for uptake of magnetofluorescent

-
- engineered nanoparticles in pancreatic cancer cells / S. Kar, A. Gajewicz, T. Puzyn, K. Roy // *Toxicology in Vitro*. – 2014. – V. 28№4. – P. 600–606.
- 97 Liu, R. Classification NanoSAR development for cytotoxicity of metal oxide nanoparticles / R. Liu, R. Rallo, S. George, Z. Ji, S. Nair, A. E. Nel, Y. Cohen // *Small*. – 2011. – V. 7№8. – P. 1118–11126.
- 98 Liu, R. Development of structure-activity relationship for metal oxide nanoparticles / R. Liu, H. Y. Zhang, Z. X. Ji, R. Rallo, T. Xia, C. H. Chang, Y. Cohen // *Nanoscale*. – 2013. – V. 5№12. – P. 5644–5653.
- 99 Luan, F. Computer-aided nanotoxicology: assessing cytotoxicity of nanoparticles under diverse experimental conditions by using a novel QSTR-perturbation approach / F. Luan, V. V., Kleandrova, H. González-Díaz, J. M. Ruso, A. Melo, A. Speck-Planche, M. N. D. S. Cordeiro // *Nanoscale*. – 2014. – V. 6№18. – P. 10623–10630.
- 100 Singh, K. P. Nano-QSAR modeling for predicting biological activity of diverse nanomaterials / K. P. Singh, S. Gupta, M. Ghorbanzadeh, M. H. Fatemi, M. Karimpour, T. Puzyn, J. H. Li // *RSC Advances*. – 2014. – V. 4№26. – P. 13215.
- 101 Sizochenko, N. From basic physics to mechanisms of toxicity: the "liquid drop" approach applied to develop predictive classification models for toxicity of metal oxide nanoparticles / N. Sizochenko, B. Rasulev, A. Gajewicz, V. Kuz'min, T. Puzyn, J. Leszczynski // *Nanoscale*. – 2014. – V. 6№22. - P 13986–13993.
- 102 Toropov, A. A. QSAR as a random event: modeling of nanoparticles uptake in PaCa2 cancer cells / A. A. Toropov, A. P. Toropova, T. Puzyn, E. Benfenati, G. Gini, D. Leszczynska, J. Leszczynski // *Chemosphere*. – 2013. – V. 92№1. – P. 31–37.
- 103 Kar, S. Periodic table-based descriptors to encode cytotoxicity profile of metal oxide nanoparticles: a mechanistic QSTR approach / S. Kar, A. Gajewicz, T.

-
- Puzyn, K. Roy, J. Leszczynski // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2014. – V. 107. – P. 162–169.
- 104 Kleandrova, V. V. Computational ecotoxicology: simultaneous prediction of ecotoxic effects of nanoparticles under different experimental conditions / V. V. Kleandrova, F. Luan, H. González-Díaz, J. M. Ruso, A. Melo, A. Speck-Planche, M. N. Cordeiro // *Environment International*. – 2014. – V. 73. – P. 288–294.
- 105 Pathakoti, K. Using experimental data of *Escherichia coli* to develop a QSAR model for predicting the photo-induced cytotoxicity of metal oxide nanoparticles / K. Pathakoti, M.-J. Huang, J. D. Watts, X. He, H.-M. Hwang // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2014. – V. 130. – P. 234–240.
- 106 Puzyn, T. Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles / T. Puzyn, B. Rasulev, A. Gajewicz, X. Hu, T. P. Dasari, A. Michalkova, J. Leszczynski // *Nature Nanotechnology*. – 2011. – V. 6 №3. – P. 175–178.
- 107 Toropov, A. A. Novel application of the CORAL software to model cytotoxicity of metal oxide nanoparticles to bacteria *Escherichia coli* / A.A. Toropov, A. P. Toropova, E. Benfenati, G. Gini, T. Puzyn, D. Leszczynska, J. Leszczynski // *Chemosphere*. – 2012. – V. 89 № 9. – P. 1098–1102.
- 108 Chau, Y. T. Quantitative Nanostructure–Activity Relationship modelling of nanoparticles / Y.T. Chau, C. W. Yap, K. Donaldson, V. Stone, C. L. Tran, W. Kreyling, A. Varnek // *RSC Advances*. – 2012. – V. 2 №22. – P. 8489–8596.
- 109 Singh, K. P. Nano-QSAR modeling for predicting biological activity of diverse nanomaterials / K.P. Singh, S. Gupta, M. Ghorbanzadeh, M. H. Fatemi, M. Karimpour, T. Puzyn, J. H. Li // *RSC Advances*. – 2014. – V. 4 № 26. – P. 13215.

-
- 110 Weissleder, R. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules / R. Weissleder, K. Kelly, E. Y. Sun, T. Shtatland, L. Josephson // *Nature Biotechnology*. – 2005. – V. 23 № 11. – P. 1418–1423.
- 111 Hu, X. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles / X. Hu, S. Cook, P. Wang, H.M. Hwang // *Science of the Total Environment*. – 2009. – V. 407. – P. 3070–3072.
- 112 Shaw, S. Y. Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity / S. Y. Shaw, E. C. Westly, M. J. Pittet, A. Subramanian, S. L. Schreiber, R. Weissleder // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – V. 105 №21. – P. 7387–7392.
- 113 Zhang, H. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation / H. Zhang, Z. Ji, T. Xia, H. Meng, C. Low-Kam, R. Liu, A. E. Nel // *ACS Nano*. – 2012. – V. 6 № 5. – P. 4349–4368.
- 114 Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances. Part II, Environmental Risk Assessment. - Luxembourg: Commission of the European Communities (CEC). – 1996. – 337 p.
- 115 Blaise, C. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms / C. Blaise, F. Gagné, J. F. Férard, P. Eullaffroy // *Environmental Toxicology*. – 2008. – V. 23 №5. – P. 591–598.
- 116 Kim, S. Model of growth by hetero-coagulation in seeded colloidal dispersions / S. Kim, C. A Zukoski // *Journal of Colloid and Interface Science*– 1990. - V. 139. - P. 198-212.
- 117 Li, X. Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: formation, morphology, and SERS activity / X. Li, J. Zhang, W. Xu, H. Jia, X. Wang, B. Yang, B. Zhao, B. Li, Y. Ozaki // *Langmuir*. – 2003. - V. 19. - P. 4285-4290.

-
- 118 Taleb, A. Synthesis of highly monodisperse silver nanoparticles from AOT reverse micelles: a way to 2D and 3D self-organization / A. Taleb, C. Petit, M. P. Pileni // *Chemistry of Materials*. – 1997. – V. 9. – P. 950–959.
- 119 Gusev, A.A. Tallow amphopolycarboxyglycinate - stabilized silver nanoparticles: new frontiers in development of plant protection products with a broad spectrum of action against phytopathogens / A.A. Gusev, A.A. Kudrinsky, O.V. Zakharova, A.I. Klimov, P.M. Zherebin, G.V. Lisichkin, I.A. Vasyukova, A.N. Denisov, Yu.A. Krutyakov // *Materials Science and Engineering C*. – 2016. – V.62. – P.152-159.
- 120 Métraux, G. S. Rapid thermal synthesis of silver nanoprisms with chemically tailorable thickness / G. S. Métraux, C. A. Mirkin // *Advanced Materials*. – 2005. – V. 17 №4. – P. 412–415.
- 121 Ершов, Б. Г. Образование долгоживущих кластеров и нуклеация серебра при γ -облучении водных растворов AgClO_4 , содержащих полифосфат / Б. Г. Ершов, Е. В. Абхалимов, Н. Л. Сухов // *Химия высоких энергий*. – 2005. - Т. 39 № 2. - С. 83-87.
- 122 Krutyakov, Yu. A. New frontiers in water purification: highly stable amphopolycarboxyglycinate-stabilized Ag–AgCl nanocomposite and its newly discovered potential / Yu. A. Krutyakov, P. M. Zherebin, A. A. Kudrinskiy, Y. V. Zubavichus, M. Y. Presniakov, A. D. Yaprntsev, G. V. Lisichkin // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2016. – V. 49 № 37. – P. 375501.
- 123 ASTM Standard E2834 – 2012 Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by nanoparticle tracking analysis (NTA). West Conshohocken, PA: ASTM International, 2012.
- 124 Строганов, Н.С. Водоросли и макрофиты как объекты для биотестирования / Н.С. Строганов, А.Г. Дмитриева, В.М. Король // Волгоград: Теоретические Вопросы Биотестирования. – 1983. – P. 153-158.

-
- 125 ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004. Т 16.1:23:3.7-2004 Токсикологические методы анализа. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов производства и потребления по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella Vulgaris* Beijer). – М. - 2012. – 54 с.
- 126 Тирас, Х.П. Прижизненная морфометрия регенерации планарии / Х. П. Тирас, Н.Ю. Сахарова // Онтогенез. – 1984. – № 15. – С. 41.
- 127 Tonkopii, V. The usage of *Daphnia magna* as alternative bioobject in ecotoxicology / V. Tonkopii, I. Iofina // ААТЕХ. – 2007. – V. 14. – P. 565–567.
- 128 ИСО 6341 – 1987 Качество воды. Определение подавления подвижности *Daphnia Magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Тест на острую токсичность, 2012. – 22 с.
- 129 Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 202: *Daphnia* Sp. Acute Immobilization Test. - Paris, France: The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2004. – 12 p.
- 130 Guidelines for the testing of chemicals. Test no.236: Fish embryo acute toxicity (Fet) Test. - Paris, France: The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2013. – 22 p.
- 131 Detrich, H.W. The zebrafish: genetics, genomics and informatics / H.W. Detrich, M. Westerfield, L. I. Zon. - Sandiego: Acad.Press, 1999. - 604 p.
- 132 Sushko, I. Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information / I. Sushko, S. Novotarskyi, R. Körner, A. K. Pandey, M. Rupp, W. Teetz, I. V. Tetko // Journal of Computer-Aided Molecular Design. – 2011. – V. 25 № 6. – P. 533–554.
- 133 Chemaxon. <https://www.chemaxon.com>
- 134 <https://www.molecular-networks.com/products/corina>

-
- 135 Hall, L. H. Molecular similarity based on novel atom-type electrotopological state indices / L. H. Hall, L. B. Kier, B. B. Brown // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 1995. – V. 35 № 6. – P. 1074–1080.
- 136 Tetko, I. V. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program / I. V. Tetko, V. Y. Tanchuk // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2002. – V. 42 № 5. – P. 1136–1145.
- 137 Todeschini, R. Molecular descriptors for chemoinformatics / Todeschini, R., Consonni, V. - Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. - V. 41
- 138 [Http://Www.Talete.Mi.It/Products/Dragon_Description.Html](http://www.taletе.mi.it/products/dragon_description.html)
- 139 Tetko, I. V. Associative neural network / I. V. Tetko // *Neural Processing Letters*. – 2002. – V. 16 № 2. – P. 187–199.
- 140 Tetko, I. V. Neural network studies. 1. Comparison of overfitting and overtraining / I. V. Tetko, D. J. Livingstone, A. I. Luik // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 1995. – V. 35 № 5. – P. 826–833.
- 141 Vorberg, S. Modeling the biodegradability of chemical compounds using the online chemical modeling environment (OCHEM) / S. Vorberg, I. V. Tetko // *Molecular Informatics*. – 2014. – V. 33 № 1. – P. 73–85.
- 142 Breiman, L. Random forests / L. Breiman // *Machine Learning*. – 2001. – V. 45 № 1. – P. 5–32.
- 143 Krutyakov Yu. A., Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects / Yu. A. Krutyakov, A.A. Kudrinskiy, A.Yu. Olenin, G.V. Lisichkin // *Russian Chemical Reviews*. – 2008. – V. 77 № 3. – P. 233-257.
- 144 Kumar, A. Phase transfer of silver nanoparticles from aqueous to organic solutions using fatty amine molecules / A. Kumar, H. Joshi, R. Pasricha, A. B. Mandale, M. Sastry // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2003. – V. 264 № 2. – P. 396–401.

-
- 145 Beamson, G. High resolution XPS of organic polymers / G. Beamson, D. Briggs // *Journal of Chemical Education*. – 1992. – V. 70 № 1. P. A25
- 146 Zhu, J.-J. High-yield synthesis of uniform ag nanowires with high aspect ratios by introducing the long-chain PVP in an improved polyol process / J.-J. Zhu, C.-X. Kan, J.-G. Wan, M. Han, G.-H. Wang, J.-J. Zhu G.-H. Wang // *Journal of Nanomaterials*. – 2011. – V. 2011. – P. 1–7.
- 147 An, J. Sculpturing effect of chloride ions in shape transformation from triangular to discal silver nanoplates / J. An, B. Tang, X. Zheng, J. Zhou, F. Dong, S. Xu, W. Xu // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – V. 112 № 39. P. 15176–15182.
- 148 Wang, Z. Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: contributions of particles and free silver ion / Z. Wang, J. Chen, X. Li, J. Shao, W. J. G. M. Peijnenburg // *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*.-2012. – V. 31 № 10. – P. 2408–2413.
- 149 Abramenko, N.B. Study of ecotoxicity of silver nanoparticles using algae / N.B. Abramenko, L.M. Kustov // *Russ. J. Phys. Chem.* - 2016. – V. 90.№ 12. – P. 2217–2220.
- 150 Kustov, L., Estimation of the toxicity of silver nanoparticles by using planarian flatworms / L.M. Kustov, K.Tiras, S. Al-Abed, N. Golovina, M. Ananyan // *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*. – 2014. – V. 42 №1. – P. 51–58
- 151 Abramenko, N.B. Study of ecotoxicity of silver nanoparticles using Daphnids / N.B. Abramenko, L.M. Kustov // *Russ. J. Phys. Chem.* – 2016. – V. 90.№ 12. – P. 2450–2453.
- 152 Asharani, P. V, Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models / P. V. Asharani, Y. Lian Wu, Z. Gong, S. Valiyaveetil // *Nanotechnology*. – 2008. – V. 19 № 25. – P. 1-8.
- 153 Kannan, R. R. Antimicrobial silver nanoparticle induces organ deformities in the developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos / R. R Kannan, A. J. A.

Jerley, M. Ranjani, V. S. G. Prakash // Journal of Biomedical Science and Engineering. – 2011. - V. 4 №4. – P. 248–254.

- 154 Кузьмин В.А. Изучение антибактериальной и антимикотической активности препарата Аргумистин /В.А. Кузьмин, А.М. Лунегов, Ю.А. Крутяков, И.В. Белкина, К.С. Савенков //Международный вестник ветеринарии. – 2015. – Т. 2. – P. 36-39.
- 155 Tropsha, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation / A. Tropsha // Molecular Informatics. – 2010. – V. 29 № 6–7. – P. 476–488.
- 156 Kovalishyn, V. QSPR modeling for predicting toxicity of nanomaterials / V. Kovalishyn, W. J. G. M. Peijnenburg, Ir. Kopernyk, N. Abramenko, L. Metelytsia // NANOCON 2015. Brno, Czech Republic, 2015. Book of abstracts. – P. 1–6.