



УДК 519.6+546.3+576.345

Академік НАН України **Ю. І. Кундієв**, **З. Р. Ульберг**,
член-кореспондент НАН України **І. М. Трахтенберг**,
член-кореспондент НАН України **І. С. Чекман**, **Т. Г. Грузіна**,
С. М. Дибкова, **Л. С. Рєзніченко**, **М. Л. Марченко**

Проблема оцінки потенційних ризиків наноматеріалів та шляхи її вирішення

Узагальнено наукові розробки, які складають підґрунтя методичного забезпечення оцінки потенційних ризиків застосування наноматеріалів та створення єдиної системи прогнозно-аналітичного визначення їх біологічної безпеки та біосумісності. В основі системи тестування біобезпечності наноматеріалів лежать найбільш чутливі до токсичної дії характеристики живого організму — системні біомаркери. Апробована система методів тестування може скласти основу нормативно-методичної бази оцінки біобезпечного використання наноматеріалів у різних галузях діяльності людини.

Беззаперечним фактом науково-технічного прогресу в світі на сьогодні є визначальна роль наноматеріалів, які синтезуються різними методами і застосовуються в практичній діяльності людини. До наноматеріалів умовно відносять дисперсні матеріали, що містять структурні елементи, геометричні розміри яких, хоча б в одному вимірі, не перевищують 100 нм і мають якісно нові функціональні та експлуатаційні характеристики [1]. Наноматеріали характеризуються зовсім іншими фізико-хімічними властивостями та біологічним впливом, ніж речовини у звичайному фізико-хімічному стані, а тому такі структури повинні бути віднесеними до нових видів матеріалів, визначення потенційного ризику яких для здоров'я людини та стану оточуючого середовища у всіх випадках є обов'язковим [2].

В країнах Європейського Союзу застосування наявних і новостворюваних наноматеріалів суворо контролюється та регулюється на законодавчому рівні. Використання наноматеріалів здійснюється лише за наявності рекомендацій, в основі яких лежать висновки і пропозиції Наукового комітету з виникнення та ідентифікації нових ризиків для здоров'я (SCENIHR) і Об'єднаного дослідницького центру (JRC). Вже до кінця 2014 р. планується

© Ю. І. Кундієв, З. Р. Ульберг, І. М. Трахтенберг, І. С. Чекман, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова,
Л. С. Рєзніченко, М. Л. Марченко, 2013

гармонізувати розроблені рекомендації з урахуванням науково-технічного прогресу в галузі створення і дослідження наноматеріалів [3].

Міжнародна організація із стандартизації (International Organization for Standardization (ISO)) створила "Технічний комітет 229 — нанотехнології" (ISO/TC 229) з метою розробки міжнародних стандартів термінології, номенклатури, метрології, специфікації, методології тестування, моделювання та імітації, а також для підготовки інструкцій для галузей охорони здоров'я та безпеки навколишнього середовища. Відзначається тенденція до об'єднання зусиль на міжнародному рівні щодо розробки комплексної системи методів виявлення наноматеріалів в об'єктах оточуючого середовища та оцінки їх впливів в умовах контрольованого та неконтрольованого потрапляння [4].

На сьогодні в Україні не існує єдиної стандартизованої системи методів оцінки біобезпеки наноматеріалів, не встановлено чітких критеріїв їх безпечності та біосумісності, не розроблені методи їх виявлення, ідентифікації і кількісного визначення в об'єктах навколишнього середовища, продовольчій сировині та харчових продуктах. Тому стає актуальною розробка, гармонізація та впровадження системи методів, алгоритму і нормативно-методичної документації щодо визначення потенційних ризиків впливу наноматеріалів на людину та навколишнє середовище для забезпечення єдиного, науково обгрунтованого підходу до оцінки безпеки наноматеріалів на етапах розробки, експертизи та сертифікації такої продукції.

У зв'язку з вищезазначеним у даній роботі здійснено узагальнення наукових розробок як підґрунтя для методичного забезпечення оцінки потенційних ризиків застосування наноматеріалів з метою створення єдиної системи прогнозно-аналітичного визначення їх біологічної безпеки та біосумісності. З огляду на широке застосування наночастинок металів у медицині, ветеринарії та промислового виробництва, наведені в роботі результати стосуються саме цього виду наноматеріалів.

Матеріали і методи дослідження. Наночастинок металів (золота, срібла, міді, цинку, заліза, молібдену) отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей відповідних металів та методом ерозивно-вибухового диспергування [5].

Біологічний вплив наночастинок металів оцінювали з використанням культур бактерій штампів-пробіонтів — *Escherichia coli* Г35 № 1-413, *Enterococcus faecalis* Г35 № 4-410, *Lactobacillus acidophilus* АН-100, *Escherichia coli* М-17, *Bifidobacterium bifidum* та культур еукаріотичних клітин: СНО-К1 — клітин яєчника китайського хом'ячка (колекція Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штампів мікроорганізмів, Київ), U937 — клітин гістіоцитарної лімфоми, перещеплюваної культури епідермоїдної карциноми гортані (НЕР-2), перещеплюваної культури тестикул поросят, клітин лінії А-549 недрібноклітинного раку легені людини, лінії НаСаТ іморталізованих нормальних кератиноцитів людини, нормальних фібробластів людини, лінії НерG2 епітеліальних клітин карциноми печінки людини, клітин лінії Colo-205 епітеліальної морфології колоректального раку людини, ембріональних клітин нирки людини лінії 29, нейробластів нейробластоми людини лінії IMR-32, клітин гліобластоми-астроцитоми людини лінії U-373 (колекція клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ).

В експериментах *in vivo* були використані лабораторні тварини (миші лінії Balb/C та щури лінії Vistar) з віварію Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (Київ). Досліди на тваринах проводили відповідно до "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях".

Оцінку потенційних ризиків наночастинок металів проводили за критеріями цитотоксичності *in vitro* з метилтіазолілтетразолієм, сульфородаміном В та барвником нейтральним червоним [6], генотоксичності *in vitro* та *in vivo* [7], мутагенності *in vitro* [8] та *in vivo* [9], стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту *in vitro* [10], біохімічними тестами *in vitro* та *in vivo* [11] і визначали гостру загальнотоксичну дію за показником LD₅₀ [12].

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали загальноприйнятими методами.

Результати та їх обговорення. У табл. 1 наведено перелік наночастинок металів різної природи та різних розмірів, синтезованих методом хімічної конденсації, які за результатами тестування їх потенційного ризику із застосуванням комплексної системи біомаркерів можна віднести до біологічно безпечних наноматеріалів.

Оцінка біологічної безпеки наночастинок металів, проведена із застосуванням системи методів, зазначених вище, засвідчила високий рівень прогностичності, адекватності та відтворюваності результатів аналізу. Встановлено, що виявлений рівень біобезпеки вивчених наночастинок металів є однаковим при використанні запропонованих фізіологічних, молекулярно-генетичних та біохімічних системних біомаркерів.

Тестування біобезпечності наночастинок металів різної природи та розміру виявило розмірну та концентраційну залежність їх токсичної дії [11]. Сучасні токсикологічні тести значною мірою базуються на використанні ліній клітин, оскільки загальновідомо, що дія хімічної речовини на живий організм проявляється на клітинному рівні. Науково обгрунтовано та експериментально доведено можливість, доцільність та ефективність застосування моделі культури клітин людини для визначення показників загальної токсичної дії в практиці токсиколого-гігієнічної оцінки наночастинок металів. Показано високу ефективність та інформативність цього методу [13].

В табл. 2 наведено показники токсичності наночастинок металів, отриманих методом ерозивно-вибухового диспергування, в експериментах *in vitro* та *in vivo*. Згідно з результатами аналізу та зіставлення даних експериментів, проведених *in vitro* в культурі клітин, *in vivo* на тваринах, і клінічної практики, показники токсичного впливу цих речовин *in vivo* порівнянні з ЕС₅₀ найбільш чутливих до дії досліджуваних сполук органоспецифічних клітин. Дослідження цитотоксичної дії наночастинок металів із застосуванням моделей культур клітин людини різного органного походження дає можливість прогнозувати особливості та рівень токсичної дії наночастинок металів для тварин і людини.

Отримані результати дають підстави рекомендувати до застосування в системі методів оцінки потенційних ризиків наноматеріалів метод клітинних моделей *in vitro*, завдяки яким можна швидко та достовірно з'ясувати потенційні органи-мішені людини в умовах гострої експозиції наночастинок металів.

Маючи систему методів тестування біобезпеки наночастинок металів, надзвичайно важливим орієнтиром є адекватний алгоритм проведення оцінки їх потенційної небезпеки. Такий алгоритм повинен враховувати як контрольоване введення наноматеріалу в живий організм (у складі лікарських та профілактичних засобів, БАДів, харчових добавок), так і ймовірність неконтрольованого попадання наноматеріалу в організм людини (проникнення внаслідок забруднення оточуючого середовища).

В обох випадках першочерговим є ідентифікація наноматеріалів *in vitro* та *in vivo*. Наступним кроком повинна бути оцінка рівня потенційної небезпеки наноматеріалу з використанням системних біомаркерів, таких як: генотоксичність; мутагенність; цитотоксичність;

Таблиця 1. Біобезпечні наночастинки металів, отримані методом хімічної конденсації

Тип наночастинки металу	Форма	Розмір частинок, нм	Концентрація препаратів наночастинки металу, мкг/мл за металом	Спосіб введення наночастинки металу	LD ₅₀	Характеристика наночастинки металів за показниками біобезпечності, що визначаються в лабораторії ІБКХ
1	2	3	4	5	6	7
Наночастинки срібла	Сферична	30,50	1080	Перитонеальне (миші лінії BALB/c, середня маса 20 ± 2 г)	Самці: 34,53 ± 3,87 мг/кг; Самки: 22,17 ± 2,36 мг/кг; Комбінована: 28,35 мг/кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <1,3 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами, не впливають на нормофлору кишечника в концентрації <3,5 мкг/мл за металом
Наночастинки золота	Сферична	30,45	38,6	—	Експериментальні дані відсутні; LD ₅₀ за даними літератури >1,5 г за металом/кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <3,8 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами, не впливають на нормофлору кишечника в концентрації <3,5 мкг/мл за металом
				Внутрішньовенне (щурі лінії Vistar, середня маса 200 ± 20 г) 1 мл препарату в концентрації 38,6 мкг/мл за металом Підшкірне (морські свинки (мурчаки))	Дослідні тварини залишались живими та здоровими при підшкірному введенні 1 мл препарату у концентрації 3,86 та 1,93 мкг/мл за металом	

Таблиця 1. Продовження

1	2	3	4	5	6	7
Наночастинки заліза (Fe ⁰)	Сферична	70, 300	20	Пероральне (миші лінії VALB/с, середня маса 20±2 г)	>5 г за металом/кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <50 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами
Наночастинки заліза з аскорбіновою кислотою 1 : 1	Сферична	40	20	Пероральне (миші лінії VALB/с, середня маса 20±2 г)	>5 г за металом /кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <50 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами
Наночастинки заліза з аскорбіновою кислотою 1 : 2	Сферична	40	200	Пероральне (миші лінії VALB/с, середня маса 20 ± 2 г)	>5 г за металом /кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <50 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами
Наночастинки міді	Сферична	40	32	Внутрішньовенне (миші лінії VALB/с, середня маса 20 ± 2 г)	>320 мг за металом /кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <50 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами
Наночастинки вісмуту	Сферична	40	2,4	Перитонеальне (миші лінії VALB/с, середня маса 20 ± 2 г)	>60 мг за металом /кг	Не генотоксичні, не цитотоксичні в концентрації <3,8 мкг/мл за металом, не мутагенні, не токсичні за біохімічними тестами

Таблиця 2. Показники токсичності для наночастинок металів, отриманих методом ерозивно-вибухового диспергування: EC₅₀ (мг/л) для культур клітин людини *in vitro* та показники токсичності *in vivo*

Об'єкт тестування	Наночастинки металів		
	срібло	мідь	молібден
Лінія клітин HaCaT EC ₅₀	80 ± 4	30 ± 5	160 ± 5
Лінія клітин A-549, EC ₅₀	27 ± 5	11 ± 0,8	200 ± 5
Лінія клітин Colo-205, EC ₅₀	13 ± 1	22 ± 3	більше 200
Лінія клітин U-373, EC ₅₀	97 ± 4	40 ± 5	більше 200
Показники токсичності <i>in vivo</i>	10 мг/л*	7–15 мг/кг**	125–370 Мо мг/кг***

*Небезпечна для здоров'я людини концентрація наночастинок срібла в повітрі за умов одноразової дії (IDLH – immediately dangerous for life or health concentration) за даними NIOSH (Національного інституту безпеки праці та охорони здоров'я США).

**LD₅₀ для мишей при внутрішньоперитонеальному введенні наночастинок міді з різними характеристиками поверхні від 33 до 100 нм за даними О. А. Богословської.

***LD₅₀ для щурів за даними інформаційної системи з оцінки ризику Університету Теннесу (США).

фізіологічні системні біомаркери – гематологічні показники та стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту; біохімічні системні біомаркери. Завдяки застосуванню такого алгоритму визначення *потенційної небезпеки наноматеріалів* встановлюють її рівень, що дає можливість намітити подальший об'єм нормативно-регламентованих токсикологічних досліджень.

Високий рівень потенційної небезпеки наноматеріалів визначається контрольованим чи можливим неконтрольованим попаданням наноматеріалу в організм людини, наявністю генотоксичної, мутагенної дії, негативним впливом на ключові біохімічні параметри та на фізіологічний стан живого організму загалом. *Середній рівень* потенційної небезпеки наноматеріалів передбачає відсутність генотоксичної, мутагенної дії та впливу на ключові біохімічні параметри і наявність негативної дії на загальний фізіологічний стан живого організму за умов контрольованого або неконтрольованого попадання наноматеріалу в організм людини. *Низький рівень* потенційної небезпеки наноматеріалів свідчить про відсутність генотоксичної, мутагенної дії, негативного впливу на ключові біохімічні параметри та на загальний фізіологічний стан живого організму.

Таким чином, за відсутності стандартизованих індикаторів токсичності наночастинок металів адекватна оцінка їх потенційного ризику можлива при застосуванні системи методів, в основі яких лежать найбільш чутливі до небезпечної дії характеристики живого організму – системні біомаркери. Апробована система методів тестування, узагальнена в даній роботі, може скласти основу нормативно-методичної бази оцінки біобезпечного використання наноматеріалів в Україні.

1. Коллоидно-химические основы нанонауки / Под. ред. А. П. Шпака, З. Р. Ульберг. – Киев: Академперіодика, 2005. – 466 с.
2. Чекман І. С., Сердюк А. М., Курдієв Ю. І., Трахтенберг І. М. та ін. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) // Довкілля та здоров'я. – 2009. – 48, № 1. – С. 3–7.
3. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee Regulatory Aspects of Nanomaterials // Summary of legislation in relation to health, safety and environment aspects of nanomaterials, regulatory research needs and related measures, Brussels, 17.6. 2008.
4. Regulating nanomaterials: a Transatlantic Agenda // EERG BR 2009/02.

5. *Методические разработки к практикуму по коллоидной химии* / Под ред. А. В. Перцова. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 128 с.
6. Трахтенберг І. М., Марченко М. Л., Безденежних Н. О., Кудрявець Ю. Й. Переваги методу дослідження токсичного впливу сполук важких металів в культурі клітин людини *in vitro* порівняно з традиційним методом *in vivo* на тваринах як більш достовірного та адекватного // *Соврем. пробл. токсикологии.* – 2010. – № 2-3. – С. 69-73.
7. Патент України на корисну модель, МПК G 01 N 33/00 G 01 N 33/48. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів / С. М. Дибкова, О. В. Годовський, М. Є. Романько, Т. Г. Грузина, З. Р. Ульберг та ін. – Заявл. 10.09.2009; Опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6. – 10 с.
8. Дибкова С. М. Оцінка мутагенної дії наночастинок золота і срібла, перспективних у біотехнології та медицині // *Вісн. пробл. біології та медицини.* – 2011. – Вип. 3. – С. 32-34.
9. *Оцінка мутагенності наноматеріалів: Метод. рекомендації.* – Київ, 2011. – 24 с.
10. Дибкова С. М. Оцінка стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини при дії наночастинок золота і срібла // *Вісн. пробл. біології та медицини.* – 2010. – Вип. 3. – С. 223-227.
11. Ульберг З. Р., Грузина Т. Г., Дибкова С. М., Резніченко Л. С. Біобезпечні наночастинок металів в наномедицині та нанобіотехнології // *Там само.* – 2010. – Вип. 4. – С. 72-77.
12. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації* / За ред. О. В. Стефанова; Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр. – Київ, 2001. – С. 390-392.
13. Трахтенберг І. М., Кудрявець Ю. Й., Марченко М. Л. та ін. Удосконалена модель мультиорганної системи токсичності ксенобіотиків на основі ко-культивування клітин людини *in vitro* // *Соврем. пробл. токсикологии.* – 2011. – № 1-2. – С. 60-64.

Державна установа "Інститут
медицини праці НАМН України", Київ
Інститут біологічної хімії
ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ
Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ

Надійшло до редакції 20.06.2012

Академик НАН України Ю. И. Кундиев, З. Р. Ульберг,
член-корреспондент НАН України И. М. Трахтенберг,
член-корреспондент НАН України И. С. Чекман, Т. Г. Грузина,
С. Н. Дыбкова, Л. С. Резниченко, М. Л. Марченко

Проблема оценки потенциальных рисков наноматериалов и пути ее решения

Обобщены научные разработки, которые составляют основу методического обеспечения оценки потенциальных рисков применения наноматериалов и создания единой системы прогнозно-аналитического определения их биологической безопасности и биосовместимости. В основе системы тестирования биобезопасности наноматериалов лежат наиболее чувствительные к токсическому действию характеристики живого организма – системные биомаркеры. Апробированная система методов тестирования может составить основу нормативно-методической базы оценки биобезопасности применения наноматериалов в различных направлениях деятельности человека.

Academician of NAS of Ukraine **Yu. I. Kundiyeu, Z. R. Ulberg,**
Corresponding Member of NAS of Ukraine **I. M. Trachtenberg,**
Corresponding Member of NAS of Ukraine **I. S. Chekman, T. G. Gruzina,**
S. N. Dybkova, L. S. Rieznichenko, M. L. Marchenko

Nanomaterials risk assessment' problem and methods of its solution

The paper summarizes scientific results constituting the basis of methodological guidelines for nanomaterials application, potential risks assessment, as well as the development of a unified system of their biosafety and biocompatibility analytical-prediction assessment. System biomarkers (characteristics of living organisms, which are most sensitive to the toxicological action) are the basis of a system for nanomaterials biosafety' testing. The approved system of testing methods can be the normative-methodological basis for the biosafety assessment of nanomaterials' application in various directions of human activity.