

УДК 620.3:619

**Корочкин Р.Б.**, кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор<sup>1</sup>  
**Понаськов М.А.**, магистр ветеринарных наук<sup>1</sup>  
**Ронищенко Б.В.**, кандидат химических наук<sup>2</sup>  
**Шманай В.В.**, кандидат химических наук, доцент<sup>2</sup>

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

## ОЦЕНКА КСЕНОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ОКИСЛЕННОГО ГРАФЕНА В ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЕ

### Резюме

Наночастицы графена и его производных представляют собой наноматериал нового поколения с высоким потенциалом использования в биомедицинских сферах. В связи с широким использованием наночастиц окисленного графена минимизация его экотоксического воздействия представляется обязательной.

В результате исследований установлено, что нано- и коллоидные частицы окисленного графена обладают ксенобиотическими свойствами, однако они существенно ниже по сравнению с наночастицами других веществ: благородного металла (серебра), биоэлементов неметалла (кремния) и металла (меди).

**Ключевые слова:** наночастицы, коллоидные частицы, окисленный графен, медь, серебро, кремния диоксид, ксенобиотик, ксенобиотические свойства, биоцидность, инфузория-туфелька, *Paramecium caudatum*.

### Summary

Nanoparticles (NPs) of graphene and its derivatives are new generation nanomaterials with high potential for use in biomedical fields. Due to the wide use of oxidized graphene NPs, minimization of its ecotoxic impact seems to be mandatory.

As a result of the research, it was found that oxidized graphene NPs have xenobiotic properties, but they are significantly lower compared to nanoparticles of other substances: a noble metal (silver), an essential bioelement-non-metal (silicon) and a metal-bioelement (copper).

**Keywords:** nanoparticles, oxidized graphene, silver, copper, xenobiotic, xenobiotic properties, biocidal activity, ciliates, *Paramecium caudatum*.

Поступила в редакцию 16.03.2023 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Графен – наноматериалом, разработанный в 2004 году. Он представляет собой аллотропную форму углерода, состоящую из слоя атомов углерода, расположенных в гексагональной решетке. Наиболее часто применяются наночастицы окисленного графена. В настоящее время они уже широко используются в медицине в качестве биосенсора для диагностики и тканевой инженерии [10], а также имеют большой потенциал для использования в ветеринарии и сельском хозяйстве [6].

Применение наночастиц неизбежно приводит к их попаданию в биосферу, в связи с чем нельзя игнорировать возможный ксенобиотический и экотоксический

эффект от их встраивания в биотический круговорот. Так как всесторонняя оценка биотоксичности наночастиц представляет собой комплексную и сложную задачу [4], востребованным является поиск удобных биологических моделей для изучения ксенобиотических свойств биочужеродных веществ [3].

Среди многих биологических тест-объектов одноклеточный протист *Paramecium caudatum* считается удобной моделью для изучения острой и длительной токсичности различных соединений, включая наноматериалы [1]. Парамеция *P. caudatum* является свободноживущей относительно крупной (до 300 мкм) подвижной пресноводной инфузорией из группы альвеолят,

широко распространенной в естественных местообитаниях. Ее подвижность регулируется скоординированным движением тысяч мельчайших ресничек, покрывающих всю поверхность клетки [9]. Диета *P. caudatum* состоит из микроорганизмов, включая бактерии, дрожжи и микроводоросли, попадающие внутрь клетки через создаваемый ресничками поток жидкости. Вполне очевидно, что наночастицы аналогичным образом могут быть доставлены из окружающей среды в клетку парамеции во время питания [11].

Интересной особенностью этих простистов является то, что они представляют собой свободноживущие эукариотические одноклеточные микроорганизмы, что делает их простыми и дешевыми, но функциональными моделями для проведения *in vivo* тестов. В связи с тем, что данный микроорганизм является убиквитарным представителем водных экосистем [7, 12], интегральная оценка биоцидного действия нано- и коллоидных частиц окисленного графена позволит определить их экотоксические свойства, что представляет очевидный научный интерес, учитывая дефицит знаний в области изучения ксенобиотических свойств ультрамелкодисперсных форм графена.

**Целью нашего исследования** была оценка ксенобиотических свойств нано- и коллоидных частиц окисленного графена. Задачи – изучение биоцидного, валеоактивного и пролиферативно ингибирующего действия препарата на основе ультрамелкодисперсных частиц окисленного графена в одноклеточной эукариотической тест-системе инфузории *P. caudatum*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценку биоцидного действия коллоидных растворов дисперсных частиц различных веществ проводили на свободноживущей инфузории *Paramecium caudatum*. Культивирование парамеций осуществляли в среде Лозина-Лозинского (рН 6,2–7,8) при температуре 20–26 °С. В качестве корма для тест-объекта служили дрожжи *Rhadorula gracilis* с добавлением зерен риса. Учёт гибели парамеций проводили в микроаквариумах под световым микроскопом в затемненном помещении с

использованием минутного таймера в секундных выражениях.

Расчет индекса биологической активности (ИБА) проводили путем математического деления значений продолжительность жизни (в секундах) инфузорий при 5-минутном воздействии 0,3 мл 8%-го раствора натрия хлорида после 24-часовой инкубации в культуральной среде с добавлением тестируемого препарата в сравнении с таковыми после культивирования без ксенобиотиков. Значение ИБА препаратов выше 1,000 свидетельствовало о валеопозитивном воздействии, а показатель ниже единицы указывал на валеонегативный эффект анализируемого вещества.

В качестве основного тестового препарата нами был использован образец коллоидного раствора ультрамелкодисперсных частиц окисленного графена со стабильными физическими и химическими параметрами, который был получен по методике, описанной в [5]. Исходная концентрация дисперсных частиц составляла 2000 мкг/мл (концентрация дисперсной фазы в коллоидах будет приводиться в статье в мкг·мл<sup>-1</sup>). Средний диаметр дисперсных частиц окисленного графена находился в диапазоне 90–120 нм, т.е. на границе наноразмерности (100 нм), представляя категорию ультрамелкодисперсных частиц.

Путем серийных разведений были получены образцы коллоидов окисленного графена в нисходящих концентрациях. Разведения исходного коллоидного раствора будут приведены в виде  $1 \times n^{-1}$ , где  $n$  – степень разведения от 0 (соответствует начальному неразведенному препарату) до 50 (соответствует 50-кратному разведению исходного препарата).

Для сравнительной оценки биотоксичности в опытах также использовали коллоидные растворы наночастиц серебра, меди и кремния диоксида. Исходная концентрация всех названных коллоидов составляла 300 мкг·мл<sup>-1</sup>, поэтому в сравнительном аспекте принимались во внимание только фактические массовые концентрации наночастиц на единицу объема (мкг·мл<sup>-1</sup>), а не разведения исходного раствора ( $1 \times n^{-1}$ ). Размер наночастиц в них находился в пределах от 20 до 40 нм.

Оценку цитотоксического действия коллоидных растворов проводили по методическим рекомендациям «Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты)». В качестве сравнительных контролей биоцидности наночастиц использовали дистиллированную воду, известный биоцид (норфлоксацин в виде 10%-ного раствора

для инъекций) и адаптоген (элеутерококк в виде аптечного жидкого экстракта).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первоначальную оценку ксенобиотических свойств коллоидных растворов проводили по качественному показателю биоцидности (таблица 1), который определяли по замедлению броуновского движения парameций.

Таблица 1. – Дозозависимое действие наночастиц окисленного графена на парameции при экспозиции 24 ч

Исследуемое вещество	Биоцидность вещества в разведениях $1 \times n^{-1}$ / концентрациях наночастиц ( $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ )										
	1/2000	2/1000	3,3/600	6,6/300	10/200	13,3/150	16,6/120	20/100	23,5/85	40/50	50/40
Контроль	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Элеутерококк**	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Норфлоксацин***	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±
Наночастицы окисленного графена	+	+	+	±	±	±	–	–	–	–	–
Наночастицы серебра*	x	x	x	+	+	+	+	+	+	+	±
Наночастицы диоксида кремния*	x	x	x	+	+	+	+	+	±	±	–
Наночастицы меди*	x	x	x	+	+	+	+	+	±	–	–

Примечание: «–» – биоцидность отсутствует; «±» – биоцидность менее 50 %; «+» – биоцидность 100 %; x – исследования не проводились; \* – данные приведены исходя из номинальной концентрации наночастиц; \*\* – данные приведены исходя из разведения галенового препарата; \*\*\* – данные приведены исходя из разведения фармакопейного раствора для парентерального введения

Результаты проведенного исследования свидетельствует о существенных различиях в степени биоцидности тестируемых препаратов. Наибольшее действие оказывали наночастицы металлов (серебра и меди), для которых только минимальные концентрации проявляли лишь относительную биоинертность с незначительной разницей биоингибирующего действия у серебра (концентрация выше  $40 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  по показателю 50%-ной биоцидности) и меди (концентрация выше  $85 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ). В связи с тем, что исходная концентрация наночастиц металлов составляли  $300 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , исследовать гипотетическую более высокую их концентрацию не представлялось возможным (в таблице 1 обозначены отметкой

«x»). Тем не менее можно предположить, что они также обладают биоцидным действием исходя из 100%-ной биоцидности исходных коллоидов.

Дисперсные частицы неметаллов (кремния диоксида и окисленного графена) проявляли значительную меньшую биоингибирующую активность по сравнению с таковыми металлов. Следует отметить, что оба эти вещества представляют окисленные формы биологически значимых элементов (кремния и углерода). Сравнение их биоцидности свидетельствует о том, что протистоингибирующая активность наночастиц кремния диоксида почти в два раза больше, чем у окисленного графена. Так, у наночастиц кремния ди-

оксида биоцидный эффект проявлялся в концентрациях выше 50–85 мкг·мл<sup>-1</sup>, в то время как у дисперсных частиц окисленного графена он определялся только в концентрации выше 150 мкг·мл<sup>-1</sup>. Полный биоцидный эффект (определялся по значению БЦ<sub>100</sub>) достигался лишь концентрацией дисперсных частиц окисленного графена в значении 600 мкг·мл<sup>-1</sup>, что в 6 раз выше, чем у наночастиц кремния диоксида (100 мкг·мл<sup>-1</sup>).

Тем не менее авторы не имеют объективных оснований утверждать, что нано- и коллоидные частицы окисленного графена имеют аналогичную кратно меньшую протистотоксичность по сравнению с другими нановеществами. Самым главным препятствием для такого категорического утверждения является фактическая разница между размерами тестированных дисперсных частиц: для окисленного графена средний размер частиц составлял 90–120 нм, а для остальных – как минимум в 4 раза

меньше (20–40 нм). Как известно, размер и форма наночастиц является одним из главных факторов, определяющих их токсические свойства [8].

Также обращает на себя внимание тот факт, что из всех тестируемых образцов коллоидных растворов только препарат из наноразмерных частиц серебра ни в каком полученном разведении не может быть признан биоинертным, так как даже наименьшая использованная концентрация (40 мкг·мл<sup>-1</sup>) оказывала протистоингибирующее действие.

На втором этапе оценки ксенобиотических свойств нано- и коллоидных частиц окисленного графена мы проводили изучение их биоцидности методом токсической нагрузки сверхгипертоническим раствором натрия хлорида, обладающего мембраноповреждающим действием. Таким путем в опыте определяли валеонегативный эффект. Результаты такой оценки представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Влияние нановеществ на резистентность парамеций (по критерию «концентрация – сопротивляемость токсической нагрузке»)

Исследуемое вещество	Биоцидность вещества в разведениях 1×n <sup>-1</sup> /концентрациях наночастиц (мкг·мл <sup>-1</sup> )										
	1/2000	2/1000	3,3/600	6,6/300	10/200	13,3/150	16,6/120	20/100	23,5/85	40/50	50/40
Контроль	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Элеутерококк**	1,355	1,480	1,560	1,216	1,11	1,005	1,01	1,003	1,005	1,001	1,002
Норфлоксацин***	–	–	–	–	–	–	–	–	0,698	1,016	1,002
Наночастицы окисленного графена	–	–	–	0,435	0,44	0,545	0,630	0,785	0,855	0,925	0,925
Наночастицы серебра*	x	x	x	–	–	–	–	–	–	–	0,499
Наночастицы диоксида кремния*	x	x	x	–	–	–	–	–	0,455	0,675	0,745
Наночастицы меди	x	x	x	–	–	–	–	–	0,589	0,789	0,856

Примечание: «–» – биоцидность отсутствует; «±» – биоцидность менее 50 %; «+» – биоцидность 100 %; x – исследования не проводились; \* – данные приведены исходя из номинальной концентрации наночастиц; \*\* – данные приведены исходя из разведения галенового препарата; \*\*\* – данные приведены исходя из разведения фармакопейного раствора для парентерального введения

Данные таблицы 2 указывают на то, что из всех тестируемых образцов только галеновый препарат элеутерококка обладал валеопозитивным действием, что выражалось в повышении сопротивляемости клеток инфузорий к сверхгипертонической нагрузке. Как известно, данный препарат рассматривается в качестве адаптогена, повышая устойчивость организма к внешним стрессорам [2]. Остальные тестируемые вещества однозначно могут быть отнесены к категории ксенобиотиков, так как любая их экспозиция снижает выносливость парameций к гипертоническому стрессу в сравнении с контролем (дистиллированной воде), показатель ИБА которого принят за 1,000. Воздействие нано- и коллоидных частиц окисленного графена в сублетальных концентрациях снижает сопротивляемость инфузорий к супергипертоническому стрессу почти вдвое (показатель ИБА 0,435–0,545 для концентраций 150–300 мкг·мл<sup>-1</sup>). По мере снижения их концентрации валеонегативное воздействие уменьшается. Так, при концентрациях 85–100 мкг·мл<sup>-1</sup> показатель ИБА составлял 78,5–85,5 % от воздействия биоинертного контроля (дистиллированной воды). Минимальные тестируемые концентрации дисперсных частиц окисленного графена (40–50 мкг·мл<sup>-1</sup>) все еще оказывали валеонегативное воздействие, однако оно может быть признано незначительным, так как показатель ИБА в этом случае составлял 0,925, что снижает жизнеспособность водных протистных микроорганизмов лишь на 7,5 %.

В целом предварительная оценка биоцидных свойств коллоидного раствора окисленного графена позволяет заключить, что в сравнении с наночастицами других веществ (серебра, меди, кремния диоксида) он оказывает заметно меньшее ксенобиотическое воздействие. Во-первых, очевидна сильная разница в значении биоцидности: для нано- и коллоидных частиц окисленного графена только концентрации выше 300 мкг·мл<sup>-1</sup> являются летальными. Во-вторых, ни один из других тестируемых препаратов на основе наночастиц не достигал такого высокого значения ИБА (0,925), как у коллоидного раствора окисленного графена в минимальной концентрации, то есть даже сильное их разведение будет оказывать большее экотоксическое воздействие.

Последний этап интегрированного биотестирования различных нановеществ включал оценку их биоактивного действия по показателям индекса интенсивности размножения протист при экспозиции сублетальной концентрации испытуемых веществ. Для элеутерококка летальная концентрация отсутствовала, т.к. данное вещество фактически является адаптогеном, характеризующимся валеопозитивным действием. Для всех тестовых препаратов сублетальная концентрация лежала в пределах 40–60 мкг·мл<sup>-1</sup>, т.е. вдвое меньше установленной летальной концентрации. В опыте в качестве оптимальной сублетальной концентрации была принята ее усредненное значение 50 мкг·мл<sup>-1</sup>. Для дисперсных частиц окисленного графена летальная концентрация лежала в пределах 300–600 мкг·мл<sup>-1</sup>, поэтому в опыт были взяты коллоидные растворы окисленного графена в двух разных значениях: 150 мкг·мл<sup>-1</sup> и 50 мкг·мл<sup>-1</sup>. Результаты такого исследования представлены в таблице 3 и дают основание утверждать, что все тестируемые нановещества могут быть признаны биоцидами, так как их сублетальные концентрации снижают интенсивность размножения парameций. В связи с тем, что индекс интенсивности размножения парameций лежит в нешироком диапазоне (от 0,462 до 0,385), можно сделать вывод, что все коллоидные растворы в оптимальных сублетальных концентрациях приблизительно одинаково ингибируют пролиферацию парameций. Данный показатель также лежит в диапазоне ингибирующего воздействия известного биоцида норфлоксацина. Наоборот, раствор элеутерококка при одинаковой с биоцидами концентрацией оказывал биостимулирующее действие и повышал интенсивность деления парameций почти в 1,6 раза (индекс интенсивности размножения инфузорий – 1,589), что объясняется его адаптогенными свойствами. Раствор нано- и коллоидных частиц окисленного графена, взятый в опыт в одинаковой с другими наночастицами концентрации (50 мкг·мл<sup>-1</sup>), оказывал минимальный пролиферативно-ингибирующий эффект на парameции, который в силу статической погрешности может быть признан игнорируемым (индекс интенсивности размножения стремился к единице – 0,989).

Таблица 3. – Влияние изучаемых препаратов в сублетальной концентрации на размножение инфузорий

Исследуемое вещество	Оптимальная сублетальная концентрация (мкг·мл <sup>-1</sup> )	Индекс интенсивности размножения инфузорий
Контроль	–	1,000
Элеутерококк	50	1,589
Норфлоксацин	50	0,450
Наночастицы окисленного графена	150*	0,428
Наночастицы окисленного графена	50**	0,989
Наночастицы серебра	50	0,390
Наночастицы меди	50	0,462
Наночастицы диоксида кремния	50	0,385

Примечание: \* – оптимальная сублетальная концентрация наночастиц окисленного графена; \*\* – концентрация, соответствующая оптимальной сублетальной концентрации наночастиц других веществ

### ВЫВОДЫ

Проведенные нами исследования позволили изучить биологическую активность нано- и коллоидных частиц окисленного графена и объективно отнести препарат на их основе к категории ксенобиотиков. Тем не менее его ксенобиотические свойства существенно ниже по сравнению с наночастицами других веществ: благородного металла (серебра), биоэлементов неметалла (кремния) и металла (меди).

Все тестируемые коллоидные растворы (наночастиц серебра, меди, кремния диоксида с исходными концентрациями 300 мкг·мл<sup>-1</sup> и окисленного графена с концентрацией дисперсных частиц 2000 мкг·мл<sup>-1</sup>) оказывают отрицательное биоактивное действие в отношении одноклеточного эукариотического тест-объекта *Paramecium caudatum* и поэтому могут быть признаны веществами с ксенобиотическими свойствами.

Биологическое влияние исследованных наночастиц выражается в биоцидном воздействии на жизнеспособность параме-

ций при достижении ими пролиферативно-ингибирующих концентраций, поэтому ни один из тестируемых препаратов не может быть признан биоинертным и эконейтральным.

Биотоксическое действие тестируемых коллоидных растворов проявляет яркий дозозависимый эффект, причем наночастицы металлов (серебра, меди) обладают более выраженными биоцидными свойствами по сравнению с таковыми неметаллов (кремния диоксида и окисленного графена).

Исследуемый препарат на основе нано- и коллоидных частиц окисленного графена оказывает наименьший интегральный ксенобиотический эффект по сравнению с другими тестируемыми нановеществами различных классов (благородный металл серебро, биоэлемент-неметалл кремний, биоэлемент-металл медь), что выражается в более низких значениях биоцидной концентрации, валеоактивного эффекта и пролиферативно ингибирующего действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красочко, П. А. Оценка биоцидного действия наночастиц металлов и биоэлементов в одноклеточной эукариотической тестсистеме / П. А. Красочко, Р. Б. Корочкин, М. А. Понаськов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2022. – Т. 52, № 1. – С. 106–113.
2. Davydov, M. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look / M. Davydov, A. D. Krikorian // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2000. – Vol. 72(3). – P. 345–393.
3. *Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean Daphnia magna and duckweed Lemna minor* / I. Blinova [et al.] // *Hydrobiologia*. – 2017. – Vol. 798, Issue 1. – P. 141–149.
4. *Fatemeh, B. Silver Nanoparticles (Ag-NPs) Illustrate the Toxicity Effect of Colchicine in Fresh Water Paramecium caudatum* // B. Fatemeh, K. Manizheh, M. Robabeh // *Advanced Science, Engineering and Medicine*. – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 178–181.
5. *Graphene oxide functionalization via epoxide ring opening in bioconjugation compatible conditions* / B. Ranishenka [et al.] // *FlatChem*. – 2021. – Vol. 27. – P. 100–235.
6. *Hill, M. R. Biodegradable and pH-responsive nanoparticles designed for site-specific delivery in agriculture* / M. R. Hill, E. J. Mackrell, C. P. Forsthoefel // *Biomacromolecules*. – 2015. – Vol. 16(4). – P. 1276–1282.
7. *Mayne, R. Toxicity and Applications of Internalised Magnetite Nanoparticles Within Live Paramecium caudatum Cells* / R. Mayne, J. Whiting, A. Adamatzky // *BioNanoScience* – 2018. – Vol. 8, Issue 1. – P. 90–94.
8. *On measuring nanoparticle toxicity and clearance with Paramecium caudatum* / R. Mayn [et al.] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9(1): 8957. – 9 p.
9. *Paramecium swimming and ciliary beating patterns: a study on four RNA interference mutations* / N. Takiguchi [et al.] // *Intergrative biology*. – 2015. – Vol. 7, Issue 1. – P. 90–100.
10. *Singh, Z. Applications and toxicity of graphene family nanomaterials and their composites* / Z. Singh // *Nanotechnology, Science and Applications*. – 2018. – Vol. 9. – P. 15–28.
11. *Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa* / V. Aruoja [et al.] // *Environmental science : Nano*. – 2015. – Vol. 2. – P. 630–644.
12. *Vlachogianni, T. Nanomaterials: Environmental Pollution, Ecological Risks and Adverse Health Effects* / T. Vlachogianni, V. National // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2014. – Vol. 8. – P. 208–226.

**ТРИКЛАМИЗОЛ**  
противопаразитарный препарат

**СОДЕРЖИТ**  
триклабендазол,  
албендазол,  
левамизола  
гидрохлорид,  
лактозу

**ПРИМЕНЯЮТ**  
при ассоциативных  
гельминтозах крупного  
рогатого скота и  
диких парнокопытных  
животных групповым  
способом с кормом или  
подкормкой однократно

WWW.BIEVM.BY