

Методы гигиенических исследований

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Шипелин В.А.¹, Шумакова А.А.¹, Сото Х.С.¹, Селифанов А.В.¹, Сидорова Ю.С.¹, Масютин А.Г.², Чернов А.И.³, Гмошинский И.В.¹, Хотимченко С.А.^{1,4}

ВЛИЯНИЕ ПЕРОРАЛЬНО ВВОДИМЫХ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ИНТЕГРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС WISTAR

¹ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва;

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва;

³ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» РАН, 119991, Москва;

⁴ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва

Введение. Одностенные углеродные нанотрубки (ОСУНТ) могут воздействовать на организм человека в результате их использования в упаковочных материалах, стимуляторах роста с/х растений и перспективных агрохимикатах. Целью работы явилось изучение влияния ОСУНТ на крыс при пероральном введении в течение 92 суток.

Материал и методы. ОСУНТ диспергировали ультразвуком в воде с 1% неионогенного ПАВ Tween-20. По данным динамического рассеяния света, электронной микроскопии и комбинационного светорассеяния в образце присутствовали как свободные, так и частично агрегированные ОСУНТ. Эксперимент проведен на пяти группах растущих самцов крыс Wistar. Дисперсию ОСУНТ добавляли к питьевой воде в дозе 0 (контроль); 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мг/кг массы тела (м. т) для групп 1–5 соответственно. Изучали уровень тревожности и когнитивную функцию в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ); определяли массу внутренних органов, проницаемость стенки тонкой кишки для макромолекул овальбумина, биохимические показатели сыворотки крови, активность глутатионпероксидазы, содержание небелковых тиолов в печени, экскрецию с мочой 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-охо-G) и селена.

Результаты. Под действием ОСУНТ наблюдали достоверные изменения содержания в сыворотке крови общего белка, мочевой кислоты, триглицеридов, холестерина, активности аспаратаминотрансферазы, относительной массы печени, а также снижение проницаемости стенки кишки для макромолекул белка. Отмечались повышение экскреции 8-охо-G, снижение активности глутатионпероксидазы, содержания глутатиона в печени, показателя обеспеченности селеном. Большинство из вышеперечисленных эффектов в большей степени проявлялись при минимальных и средних дозах ОСУНТ, чем при максимальных. Влияния ОСУНТ на поведенческие реакции выявлено не было.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о наличии у ОСУНТ признаков токсического действия в дозе 0,1 мг/кг массы тела в сутки и менее.

Ключевые слова: одностенные углеродные нанотрубки; крысы; пероральная токсичность; всасывание макромолекул; окислительный стресс; глутатион, селен.

Для цитирования: Шипелин В.А., Шумакова А.А., Сото Х.С., Селифанов А.В., Сидорова Ю.С., Масютин А.Г., Чернов А.И., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Влияние перорально вводимых одностенных углеродных нанотрубок на интегральные и биохимические показатели крыс Wistar. *Гигиена и санитария*. 2019; 98 (3): 332-338. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-3-332-338>

Для корреспонденции: Гмошинский Иван Всеволодович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, г. Москва. E-mail: gmosh@ion.ru

Финансирование. Работа проведена за счёт средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема ФАНО России № 0529-2014-0045).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.11.2018

Принята к печати 06.02.2019

Shipelin V.A.¹, Shumakova A.A.¹, Soto Kh.S.¹, Selifanov A.V.¹, Sidorova Yu.S.¹, Masyutin A.G.², Chernov A.I.³, Gmoshinski I.V.¹, Khotimchenko S.A.^{1,4}

INFLUENCE OF OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES INGESTION BY RATS ON THEIR INTEGRAL AND BIOCHEMICAL INDICES

¹Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russian Federation;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation;

³Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) can affect the human body as a result of their use in packaging materials, growth stimulators of agricultural plants and promising agrochemicals.

The aim of the study was to investigate the effect of SWCNT on integral and biochemical indices on the model of oral administration to rats in a subacute experiment with duration of 92 days.

Material and methods. SWCNT were dispersed by ultrasound in water with 1% by weight of the non-ionic surfactant Tween 20. According to the data of dynamic light scattering, electron microscopy, and Raman light scattering the sample containing both free and partially aggregated SWCNTs. The experiment was carried out on 5 groups of growing male Wistar rats. The SWCNT dispersion was added to the drinking water at doses (control); of 0.01; 0.1; 1.0

and 10 mg/kg body weight in groups from the 1st to the 5th group. We studied the level of anxiety and cognitive function in the test of the "Conditional Reflex of Passive Avoidance" (CRPA); the mass of internal organs, the permeability of the small intestine wall for ovalbumin macromolecules, the biochemical parameters of blood serum, the activity of glutathione peroxidase, the content of non-protein thiols in the liver, urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-G) and selenium.

Results. As a result of SWCNTs consumption there were found significant changes in the content of total protein, uric acid, triglycerides, cholesterol in the blood serum, the increased activity of aspartate aminotransferase, the relative mass of the liver; and decreased the permeability of the intestinal wall for macromolecules of the protein. There have been shifts in individual antioxidant protection indices, including increased 8-oxo-G excretion, decreased glutathione peroxidase activity, glutathione content in the liver, and selenium availability. Most of the above effects did not show a dose dependence of the nanomaterial and were more pronounced at minimal and medium doses of SWCNTs than at maximum doses. The effect of SWCNTs on the behavioral responses of animals was not revealed.

Conclusion. Therefore, SWCNT show signs of toxic effects at a dose of 0.1 mg/kg body weight in a day or less.

Key words: single-walled carbon nanotubes; rats; oral toxicity; absorption of macromolecules; oxidative stress; glutathione; selenium.

For citation: Shipelin V.A., Shumakova A.A., Soto Kh.S., Selifanov A.V., Sidorova Yu.S., Masyutin A.G., Chernov A.I., Gmoshinski I.V., Khotimchenko S.A. Influence of single-walled carbon nanotubes ingestion by rats on their integral and biochemical indices. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(3): 332-338. (In Russ.). DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-3-332-338

For correspondence: Ivan V. Gmoshinski, MD, Ph.D., D.Sci., D.Sc, Ph.D. in Biology, leading researcher of the Department of Food Toxicology and Evaluation of Nanotechnology Safety, Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: gmosh@ion.ru.

Information about the author:

Shipelin V.A., <http://orcid.org/0000-0002-0015-8735>; Shumakova A.A., <http://orcid.org/0000-0003-1373-4436>;

Soto Kh.S., <http://orcid.org/0000-0001-6622-5251>; Chernov A.I., <http://orcid.org/0000-0002-6492-9068>;

Gmoshinski I.V., <http://orcid.org/0000-0002-3671-6508>; Khotimchenko S.A., <http://orcid.org/0000-0002-5340-9649>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The work was carried out at the expense of subsidies for the implementation of the state task in the framework of the Fundamental Scientific Research Program (topic of the Federal Agency of Scientific Interventions in the Russian Federation No. 0529-2014-0045).

Received: 21 November 2018

Accepted: 06 February 2019

Введение

Одностенные углеродные нанотрубки (ОСУНТ) являются новым видом нанотехнологической продукции и производятся в промышленных масштабах во всём мире для использования в микроэлектронике, при изготовлении токопроводящих покрытий, углеродных композитных материалов для авиационной и автомобильной промышленности. Существуют разработки, включающие использование ОСУНТ в качестве носителей фармакологических препаратов [1, 2]. Оценка риска ОСУНТ требует учёта всех сценариев их поступления в организм человека, в том числе через воду и пищевую продукцию. Известно, что ОСУНТ токсичны при парентеральном [3] и ингаляционном [4] поступлении в организм лабораторных животных, что проявляется в развитии воспаления, гранулём и фиброза ткани лёгких и печени. Однако биологические эффекты ОСУНТ при поступлении в желудочно-кишечный тракт в литературе изучены недостаточно. В единственном исследовании [5] при пероральном введении мышам ОСУНТ длиной более 1 мкм в очень высокой дозе (1000 мг/кг массы тела (м.т.)) никаких признаков токсичности выявлено не было. Вместе с тем известно, что многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ), являющиеся близким структурным и химическим аналогом ОСУНТ, парадоксальным образом чаще проявляют своё биологическое действие в малых и сверхмалых дозах, чем в высоких [6–8]. В связи с этим целью исследования явилось изучение в подостром эксперименте в течение 92 суток интегральных и биохимических показателей, характеризующих биологическое действие ОСУНТ на организм лабораторных крыс при их поступлении с питьевой водой в широком интервале доз.

Материал и методы

В работе был исследован препарат ОСУНТ производства фирмы ООО «Углерод-ЧГ» (Россия, МО, г. Черноголовка). Для получения его стабильных водных дисперсий использовали метод, апробированный ранее на препарате МУНТ [9], и состоящий в обработке ультразвуком в 1%-ном растворе по объёму поверхностно-активного вещества Tween-20 (далее – «носитель»). Характеристику состояния ОСУНТ в полученных водных дисперсиях осуществляли методами трансмиссионной электронной

микроскопии, комбинационного рассеяния света и динамического рассеяния света, согласно [9].

Исследования на животных выполнялись в соответствии с Российскими и Международными требованиями надлежащей лабораторной практики [10, 11]. Эксперимент был проведён на 80 крысах самца линии Вистар средней исходной массой 80 г, полученных из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Животные получали сухой сбалансированный корм производства фирмы ООО «Лабораторкорм» (Россия) в режиме неограниченного доступа. Крыс размещали по 2 особи в клетках из поликарбоната при 12/12-часовом режиме освещённости и температуре 21 ± 1 °C. Все крысы были разделены методом случайной выборки на 5 групп по 16 особей; исходная масса тела в группах не различалась ($p > 0,1$ ANOVA). В течение 92 суток животные получали вместе с питьевой водой носитель (первая, контрольная группа) или разведения в растворе носителя дисперсий ОСУНТ, приготовленные, как указано в [9]. Объёмы потребляемой жидкости ежедневно измеряли и рассчитывали дозу ОСУНТ, которая составила в опытных группах животных (со 2-й по 5-ю), 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мг/кг м.т. соответственно. Доза носителя во всех группах не различалась и составляла в среднем 2 г/кг м.т. в сутки.

В ходе наблюдения крыс ежедневно взвешивали и оценивали их состояние. С 65 по 86 сутки опыта у 8 животных каждой группы, выбранных случайным образом, оценивали уровень тревожности и когнитивную функцию, используя тест Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) согласно [12]. За 3 суток до окончания эксперимента у крыс проводили сбор мочи в течение 16 ч в индивидуальных обменных клетках.

Выведение животных из эксперимента осуществляли на 93-е сутки после 16-часового голодания путём обескровливания из нижней полой вены под глубокой эфирной анестезией. Для оценки барьерной функции желудочно-кишечного тракта за 3 часа до эвтаназии крысам вводили внутривенно через зонд куриный овальбумин (ОВА) в дозе 2 г/кг м.т. Массу отобранных внутренних органов (печень, почки, селезёнка, сердце, лёгкие, тимус, гонады, надпочечники, головной мозг) определяли на электронных весах с точностью $\pm 0,01$ г, отбирали кровь для исследования концентрации антигенного ОВА и биохимических показателей.

Содержание белкового антигена ОВА в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного двухвалентного иммуноферментного теста на полистироле. Величину всасывания ОВА в % от введённой дозы в расчёте на всю кровь рассчитывали с учётом гематокрита, исходя из предположения, что масса крови крысы составляет 6% от массы тела. Биохимические показатели сыворотки определяли на биохимическом анализаторе Konelab-20i (Финляндия); активность глутатионпероксидазы – спектрофотометрическим методом, согласно [13], с незначительными модификациями; содержание небелковых тиолов в печени – спектрофотометрическим методом с реактивом Элмана. Степень окислительного повреждения ДНК оценивали по экскреции с мочой 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-охо-G), который определяли методом обращённофазовой ВЭЖХ на колонке C18 с трёхуровневым квадрупольным масс-спектрометрическим детектором [9]. Содержание креатинина в моче определяли спектрофотометрическим методом с креатиновой кислотой, селена – спектрофлуориметрическим методом с 2,3-диаминонафталином [14].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS 18.0. Расчёт включал определение выборочного среднего, стандартной ошибки, вероятности принятия нуль-гипотезы о совпадении распределений сравниваемых выборок согласно критерию Стьюдента, Манна–Уитни и ANOVA. Достоверность различия долевых показателей оценивали с использованием критерия χ^2 . Различия признавали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика наноматериала. В результате ультразвукового диспергирования в водном растворе носителя ОСУНТ в максимальной концентрации 100 мкг/см³ давали интенсивно окрашенный однородный коллоидный раствор, стабильный в течение минимум 1 суток. Анализ полученных водных дисперсий методом динамического рассеяния света показал (рис. 1, а), что непосредственно после ультразвуковой обработки наблюдается бимодальное распределение по размерам агрегатов (клубков) ОСУНТ со средними гидродинамическими диаметрами 161 нм (98% по числу частиц) и 1100 нм (2%), что качественно указывает на высокую степень диспергирования образца.

Электронно-микроскопическое исследование (см. рис. 1 б, в) показало, что ОСУНТ осаждаются на подложку из водных дисперсий в виде индивидуальных волокнистых объектов диаметром около 5 нм и длиной более 1000 нм и некоторого количества сферических частиц диаметром 5–10 нм (предположительно – аморфного углерода). Снятие от выбранной области изображения энергодисперсионных рентгеновских спектров не выявило в значимых количествах эмиссионных линий элементов, входящих в состав металлического катализатора (кобальт, никель), что не позволило идентифицировать вышеуказанные сферические структуры как наночастицы металлов или их оксидов*. Наличие в дифрактограмме образца непрерывных concentрических колец указывает на содержание в нем поликристаллической углеродной структуры, соответствующей эталонному образцу ОСУНТ. Методом энергодисперсионной спектроскопии в выделенной области образца показано наличие в его составе атомов железа, кобальта и меди, входящих в состав металлического катализатора и составляющих, по данным производителя, не более 2% препарата ОСУНТ.

На спектрах комбинационного рассеяния света материала, использованного для приготовления суспензий и самих высушенных суспензий (см. рис. 1, з, д), присутствует спектральная компонента при 1589 см⁻¹, относящаяся к продольным колебаниям атомов углерода для одностенных нанотрубок, и компонента в области «дыхательных» мод (100–250 см⁻¹), отвечающая радикальным колебаниям атома углерода одностенной нанотрубки. В совокупности полученные данные позволяют охарактеризовать изученные образцы как одностенные углеродные нанотрубки с диаметрами 1,35–1,95 нм. При этом видно, что нанотрубки присутствуют также и в суспензиях, использованных для проведения экспериментов на животных.

* Спектры ЭДС представлены в электронном приложении к статье.

В совокупности полученные данные позволяют характеризовать использованный препарат как ОСУНТ с примесью аморфного углерода и двухслойных нанотрубок, что соответствует спецификации производителя.

Интегральные показатели крыс, получавших ОСУНТ. В период эксперимента крысы контрольной и всех опытных групп были активны, имели нормальный внешний вид и стул, признаков заболеваний выявлено не было, летальность отсутствовала. Объёмы потребляемой жидкости и дозы содержащихся в ней ОСУНТ и носителя в расчёте на единицу м. т. практически не изменялись на протяжении всего исследования. Как следует из данных рис. 2, а, крысы всех групп постоянно прибавляли в массе тела, за исключением кратковременной задержки у животных групп 3 и 4 в районе пятой недели эксперимента. Однако средняя масса тела животных группы 4 (ОСУНТ, 1 мг/кг м.т.) была незначительно по абсолютной величине (приблизительно на 10%), но достоверно ($p < 0,05$, парный t -тест Стьюдента) снижена в сравнении с контролем; особенно заметным это отставание было со второй трети эксперимента (после 35-го дня).

При изучении нейротоксичности и влияния ОСУНТ на кратковременную и долговременную память, а также уровень тревожности при первом тестировании методом УРПИ крысы всех пяти групп зашли в тёмный отсек камеры, где получили раздражение кожи лап электрическим током 0,4 мА. Время латенции до входа в тёмный отсек различалось между группами статистически недостоверно ($p > 0,05$, t -тест Стьюдента). При втором тестировании (через 24 ч), рефлекс закрепился у 8/8 (100%) животных первой группы, 7/8 (87%) у животных групп 3 и 5 и 6/8 (75%) у крыс групп 2 и 4 (все различия между группами недостоверны $p > 0,05$, критерий χ^2). При третьем тестировании (через 21 сут) сохранение памятного следа у крыс групп 1–5 составило соответственно 50, 75, 75, 62 и 75% и также различалось недостоверно. Таким образом, проведённые исследования не выявили влияния ОСУНТ на состояние когнитивной функции и уровень тревожности животных.

Определение относительной массы органов животных на секции при их выведении из эксперимента на 93-й день показало (рис. 2, б), что у животных группы 4 отмечается достоверное ($p < 0,05$) повышение массы печени на 7% в сравнении с контролем. Для остальных исследованных органов достоверных изменений относительной массы отмечено не было.

Всасывание в кровь перорально введённого антигенного ОВА (рис. 2, в) было во всех случаях ниже $2 \cdot 10^{-5}$ от введённой дозы, что характерно для крыс старше 3–4 месяцев жизни [15]. При этом потребление ОСУНТ животными всех четырёх опытных групп приводило к снижению среднего уровня в крови антигенного ОВА в 1,3–1,9 раза по сравнению с контрольной группой; для группы 5 это различие было достоверным ($p < 0,05$). Сопоставление этих данных с величинами внутрилабораторной нормы всасывания ОВА у контрольных животных того же пола и возраста, получавших дистиллированную воду [9], показало, что уровень всосавшегося ОВА, по-видимому, был повышен у крыс первой группы, получавшей только носитель, тогда как введение ОСУНТ приводит к относительной нормализации данного показателя.

Биохимические показатели. Определение биохимических показателей сыворотки крови не выявило достоверных различий между группами животных в уровнях глюкозы, альбумина, креатинина, мочевины, активностях АЛТ и щелочной фосфатазы (данные не показаны). При этом отмечено достоверное снижение в сравнении с контролем уровня мочевой кислоты у крыс группы 3, триглицеридов в группе 2, общего холестерина в группах 4 и 5 (см. таблицу). Содержание общего белка было незначительно (на 4–6%) снижено в группе 5 ($p < 0,05$ в сравнении с группой 2). Активности печёночной аспаратамино-трансферазы (АСТ), несмотря на наличие некоторых различий между группами, не выходили за пределы нормальных значений для животных данного возраста, пола и линии. Экскреция креатинина с мочой, составлявшая в контрольной группе 136,1 ± 8,2 мкмоль/16 ч ($n = 8$), достоверно снижалась в группе 5 до 112,4 ± 7,1 ($p < 0,05$), а в группах 2 и 3 демонстрировала тенденцию к снижению.

На фоне этих, в целом незначительных изменений обращают на себя внимание сдвиги в отдельных показателях систе-

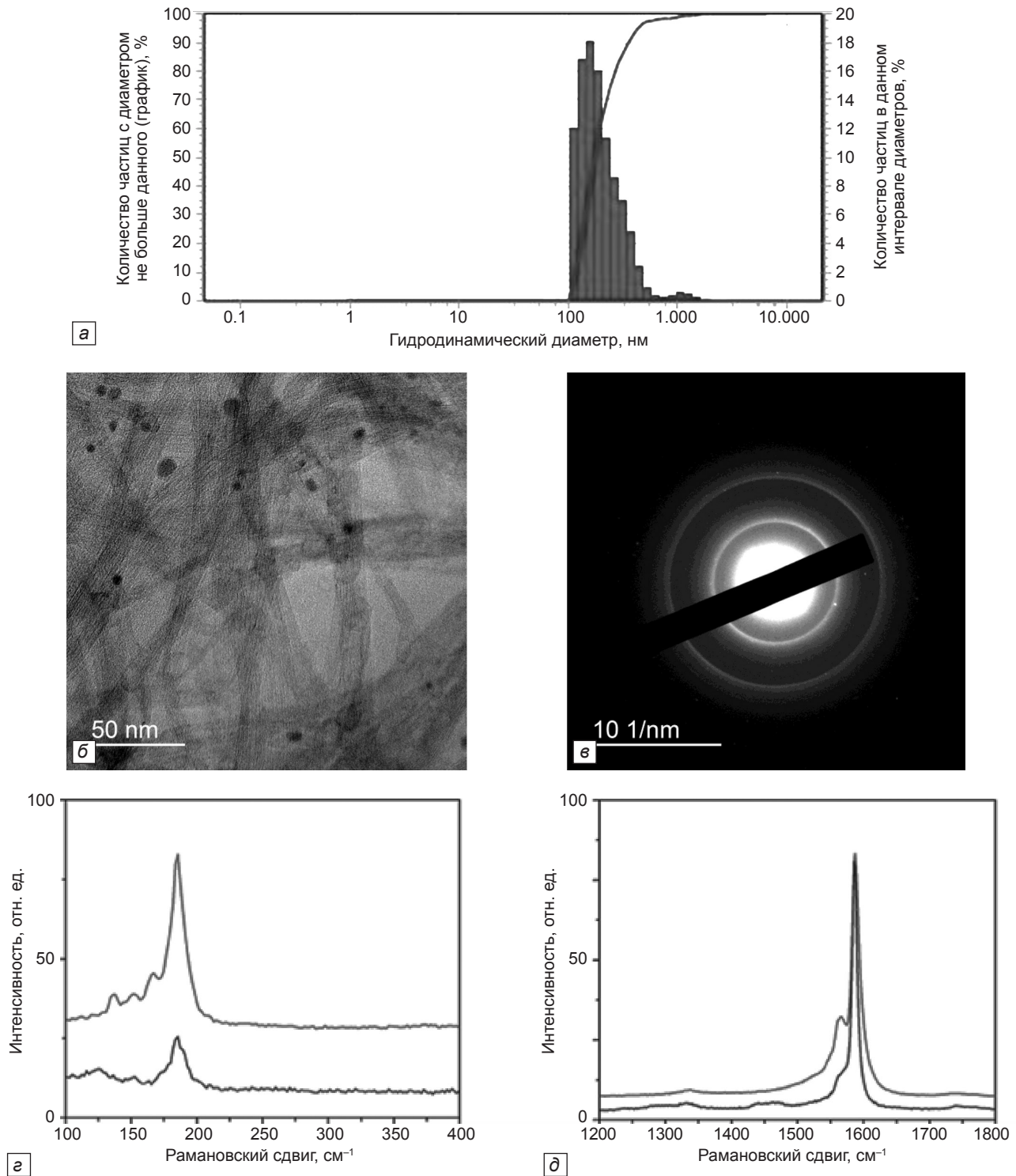


Рис. 1. Характеристика дисперсии ОСУНТ физико-химическими методами: *а* – распределение частиц дисперсной фазы по величине среднего гидродинамического диаметра по данным динамического рассеяния света; *б* – репрезентативная микрофотография; *в* – дифракционная картина частиц ОСУНТ, осаждённых на подложку из дисперсии в носителе; просвечивающий электронный микроскоп Jeol 2100 (Jeol, Япония, увеличение $\times 340\,000$); *г*, *д* – спектры комбинационного рассеяния света исходных (верхняя кривая) и осаждённых из водной дисперсии носителя (нижняя кривая) образцов ОСУНТ в двух спектральных диапазонах.

мы глутатиона и антиоксидантной защиты, представленные на рис. 3. Так, в группе 2 (ОСУНТ 0,01 мг/кг м. т.) отмечалось достоверное снижение общего содержания восстановленного глутатиона в печени, в группах 2 и 5 (ОСУНТ 10 мг/кг м. т.) – снижение общей экскреции селена с мочой, в группах 2, 3 и 4 – уменьшение активности селензависимой глутатионперок-

сидазы эритроцитов, в группе 3 – достоверное возрастание экскреции с мочой 8-охо-G, являющегося продуктом окислительной деструкции ДНК. Перечисленные изменения указывают на возможное ослабление системы антиоксидантной защиты и обеспеченности селеном у крыс, получавших ОСУНТ в различных дозах.

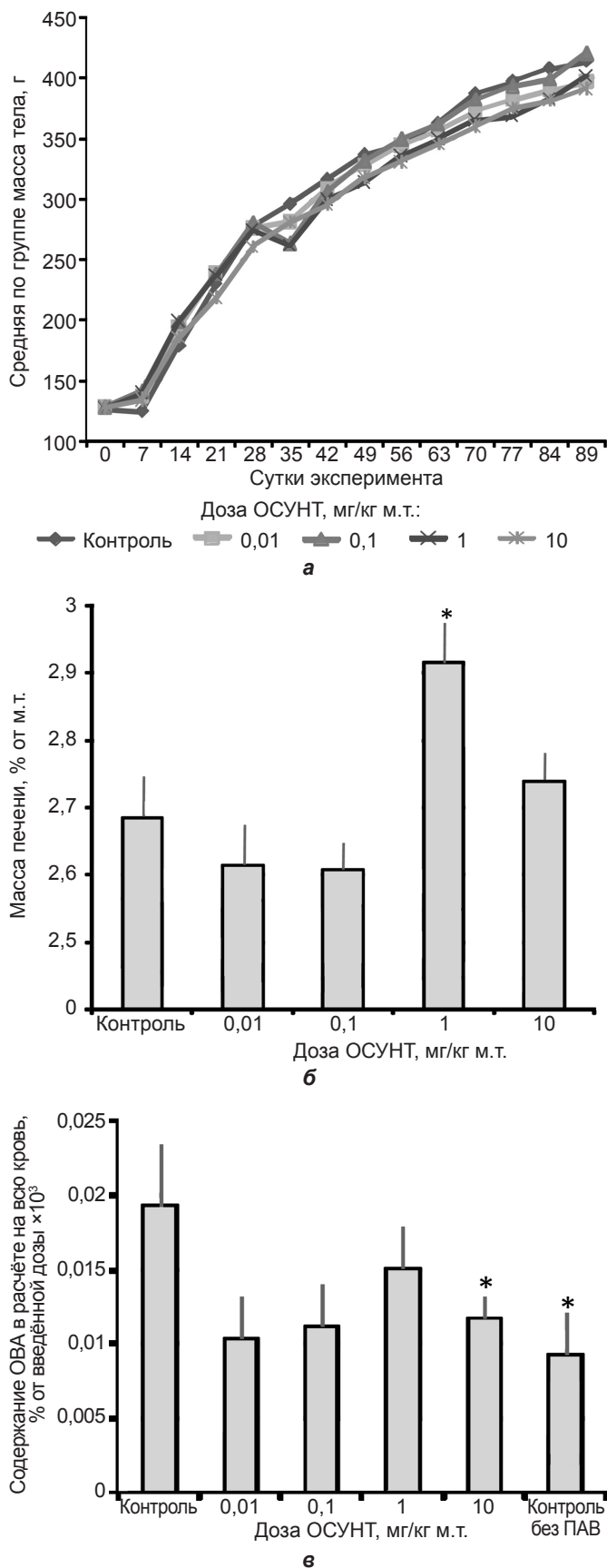


Рис. 2. Интегральные показатели организма крыс, получавших дисперсии ОСУНТ в водном растворе носителя: а – прибавка массы тела; б – относительная масса печени крыс при выведении из эксперимента; в – всасывание в кровь антигенного овальбумина через 3 ч после его внутрижелудочного введения на 93 сутки эксперимента; $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Обсуждение

Как показали проведённые исследования, ультразвуковая обработка ОСУНТ в растворе носителя, в качестве которого было использовано биосовместимое поверхностно-активное вещество Tween-20, являющееся разрешённой пищевой добавкой E433 [16], приводит к получению коллоидных систем (дисперсий), содержащих значительную часть ОСУНТ в свободном, дезагрегированном виде, по крайней мере, при их низкой концентрации (что соответствует дозе 0,01 и 0,1 мг/кг м.т. при введении животным). Однако по мере увеличения концентрации ОСУНТ степень их агрегации возрастает, а при последующем действии факторов энтеральной среды (желудочный сок, желчь, липазы), во всяком случае, не уменьшается, как это следует из данных литературы [17, 18]. Процессы агрегации УНТ могут значительно видоизменить для них зависимость доза-эффект *in vivo*, что делает в ряде случаев проблематичной их токсикологическую оценку [19]. Кроме того, нужно иметь в виду, что особый вклад в токсичность ОСУНТ могут вносить их фрагментированные отломки, которые могут образовываться под действием ультразвука, что было обнаружено в исследованиях [20, 21] и в том числе обсуждалось в нашей предыдущей работе на МУНТ [22]. Тем не менее, как показали результаты проведённых нами исследований, в явном виде отломки ОСУНТ не были обнаружены как при анализе образцов методом трансмиссионной электронной микроскопии, так и методом динамического лазерного светорассеяния. Также известно, что сами по себе фрагментированные нанотрубки могут присутствовать в нативном порошке ОСУНТ по причине их низкой устойчивости к фрагментации при физическом воздействии.

По результатам эксперимента 92-суточная пероральная экспозиция крыс водными дисперсиями ОСУНТ приводит к неоднозначным изменениям в интегральных и биохимических показателях, имеющих такую направленность, которая не позволяет интерпретировать их как вредные (токсические). Это относится к влиянию ОСУНТ на уровень триглицеридов, общего холестерина, активность АСТ, экскрецию креатинина. Наиболее отчётливо «протективный» эффект ОСУНТ выявился по отношению к проницаемости кишечного барьера для макромолекул ОВА, которая могла быть, по-видимому, повышенной у животных первой группы, получавших носитель. Механизм такого эффекта, показанного ранее также для МУНТ [9], может состоять во влиянии нанотрубок на реологические свойства пристеночного слоя кишечной слизи [20], что создаёт препятствие диффузии макромолекул к поверхности всасывающего эпителия. В отличие от МУНТ [9], ОСУНТ в настоящем исследовании не оказывали влияние на массу тимуса, надпочечников и головного мозга; не повышали уровень креатинина в плазме крови.

С другой стороны, для ОСУНТ были характерны отдельные эффекты, не характерные для МУНТ и не описанные в литературе, которые могут быть интерпретированы как неблагоприятные. Это относится, во-первых, к увеличению относительной массы печени и задержке скорости роста крыс группы 4 (доза ОСУНТ 1 мг/кг м.т.). Во-вторых, наблюдавшиеся изменения в содержании глутатиона печени, активности глутатионпероксидазы и экскреции 8-охо-G свидетельствуют о возможном неблагоприятном воздействии ОСУНТ на систему антиоксидантной защиты. Ближайшим аналогом этих эффектов может быть усиление оксидантного стресса у животных, получавших с питьевой водой дисперсии МУНТ или микрочастиц древесного угля [6]. Однако в нашем предыдущем исследовании [9] признаков прооксидантного действия МУНТ на организм крыс выявлено не было. Причина этих расхождений, помимо возможных очевидных причин в физико-химической природе и степени дисперсности различных углеродных материалов, может состоять как в сложном, немономонном характере зависимости эффектов МУНТ и ОСУНТ от их дозы, так и от условий диспергирования УНТ. Как видно из данных на рис. 3, максимум прооксидантного действия ОСУНТ наблюдается, как правило, не при их максимальной, а, напротив, при наименьшей (0,01 мг/кг м.т.) или промежуточной (0,1 мг/кг м.т.) дозе. Можно предположить,

Биохимические показатели* плазмы крови крыс групп 1–5 (по 6 животных в группе) на 92-е сутки эксперимента

Группа	Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.	АСТ, ед/см ³	Белок общий, г/дм ³	Мочевая кислота, мкмоль/дм ³	Триглицериды, моль/дм ³	Холестерин, моль/дм ³
1	0	160 ± 13	61,3 ± 2,2	63,3 ± 4,1 ³	1,64 ± 0,18 ²	2,60 ± 0,08 ^{4,5}
2	0,01	155 ± 11	63,6 ± 2,2 ⁵	59,9 ± 6,3	1,09 ± 0,03 ¹	2,33 ± 0,16
3	0,1	162 ± 8 ⁵	61,7 ± 1,0	52,9 ± 2,0 ¹	1,74 ± 0,40	2,25 ± 0,20
4	1,0	139 ± 10	63,2 ± 1,6	68,1 ± 12,9	1,24 ± 0,11	2,07 ± 0,20 ¹
5	10	130 ± 13 ³	59,0 ± 1,1 ²	68,3 ± 8,7	1,45 ± 0,15	2,06 ± 0,19 ¹
Норма**		101~161	58,1~71,1	85,5~97,0	0,96~1,44	1,6~2,6

Примечание. 1–5 – номера групп, различие с которыми достоверно, $p < 0,05$; t -тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни; * – достоверных различий в уровнях глюкозы, альбумина, креатинина, мочевины, активностях АЛТ и щелочной фосфатазы не выявлено (данные не показаны); ** – интервал нормальных значений для животных данной линии, пола и возраста согласно [25].

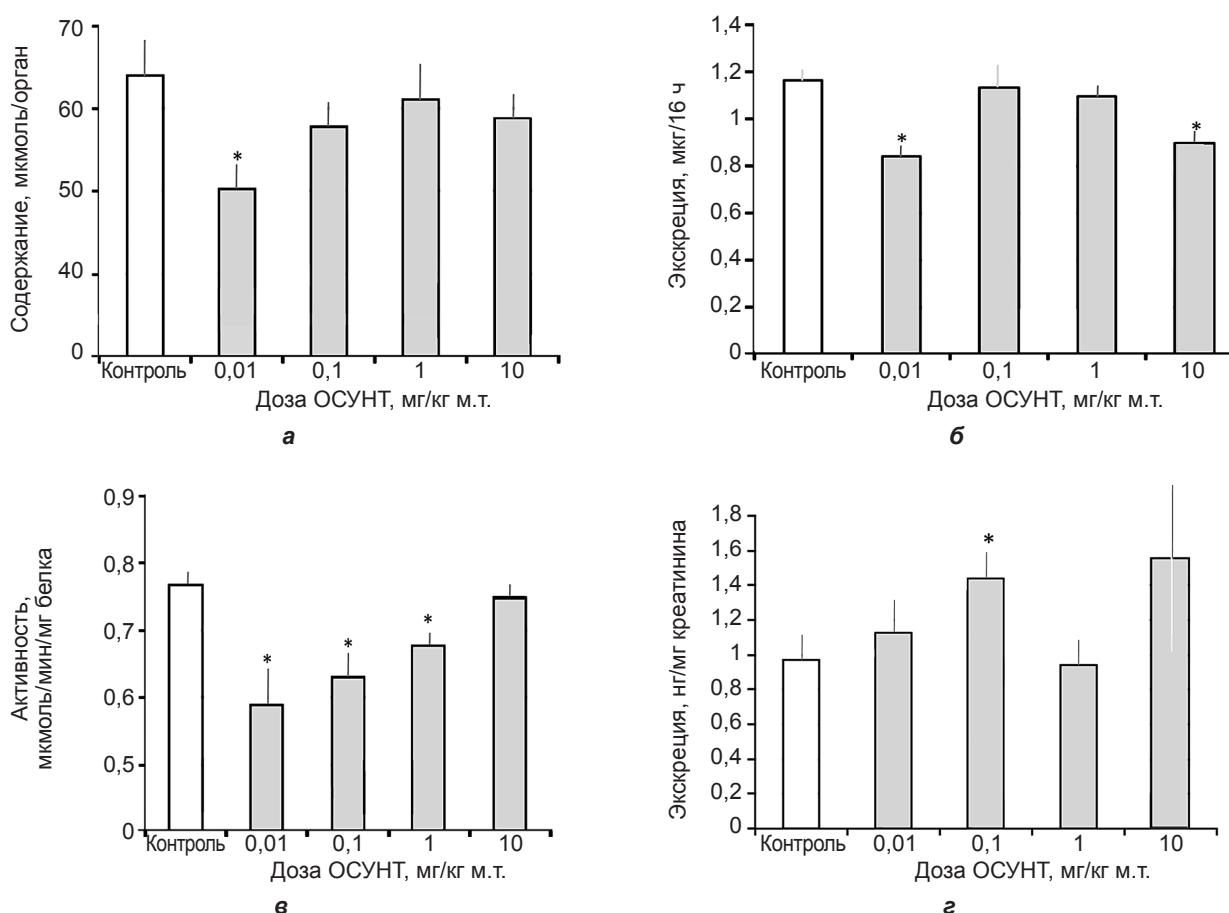


Рис. 3. Показатели, характеризующие состояние системы антиоксидантной защиты и оксидантного стресса крыс при выведении из эксперимента: а – восстановленный глутатион печени; б – экскреция селена с мочой; в – активность селензависимой глутатионпероксидазы эритроцитов; г – удельная экскреция 8-охо-G с мочой.

что эффекты агрегации ОСУНТ при их высоких дозах являются фактором, препятствующим проявлению их биологического действия, безотносительно того, проявляется ли оно в результате их возможной [21] системной транслокации либо как вторичное следствие их местного воздействия на ассоциированную с кишкой лимфоидную ткань и/или кишечную микрофлору. Выбор между этими альтернативными объяснениями биологических эффектов МУНТ не может быть сделан на основе полученных данных и требует проведения дополнительных исследований.

Заключение

Таким образом, в результате 92-суточной пероральной экспозиции крыс водными дисперсиями ОСУНТ последние продемонстрировали ряд биологических эффектов в отношении интегральных, биохимических показателей и состояния системы антиоксидантной защиты, не имеющих однозначной направленности и не демонстрирующих определенной зависимости от дозы наноматериала. Лежащие в основе этих эффектов механизмы, которые предположительно могут быть связаны с воз-

действием ОСУНТ на иммунную систему и кишечный микробиоценоз, требуют проведения дополнительных исследований иммунологическими, протеомными, микробиологическими и морфологическими методами.

Л и т е р а т у р а

(пп. 1–5, 7-9, 11–12, 15–18, 20–25 см. References)

6. Хрипач Л.В., Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Князева Т.Д., Коганова З.И., Железняк Е.В. и др. Влияние углеродных нанотрубок и активированного угля на биохимические показатели состояния организма при хроническом введении препаратов крысам с питьевой водой. *Гигиена и санитария*. 2014; 5: 36-42.
10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».
13. Разыграев А.В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты). Клинико-лабораторный консилуим. 2004; 4: 19-22.
14. Голубкина Н.А. Флуориметрический метод определения селена. *Журнал аналитической химии*. 1995; 50 (8): 492-7.
19. Горшенёва Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2014; 6 (18): 48-55.

References

1. De Volder M.F., Tawfik S.H., Baughman R.H., Hart A.J. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*. 2013; 339 (6119): 535-9. Doi: 10.1126/science.1222453
2. Coyuco J.C., Liu Y., Tan B.-J., Chiu G.N.C. Functionalized carbon nanomaterials: exploring the interactions with Caco-2 cells for potential oral drug delivery. *Int. J. Nanomedicine*. 2011; 6: 2253-63.
3. Patlolla A., McGinnis B., Tchounwou P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotube in Swiss-Webster mice. *J. Appl. Toxicol.* 2011; 31(1): 75–83.
4. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R., Murray A.R., Johnson V.J., Potapovich A.I. et al. Un-usual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 289 (5): 698-708.
5. Kolosnjaj-Tabi J., Hartman K.B., Boudjema S., Ananta J.S., Morgant G., Szwarc H. et al. In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. *ACS Nano*. 2010; 4 (3): 1481-92.
6. Khrpach L.V., Rakhmanin Yu.A., Mikhailova R.I., Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Zheleznyak E.V. et al. Biochemical effects of chronic peroral administration of carbon nanotubes and activated charcoal in drinking water in rats. *Gigiena i sanitariya*. 2014; 5: 36-42. (in Russian)
7. Philbrook N.A., Walker V.K., Afroz A.R., Saleh N.B., Winn L.M. Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 2011; 32 (4): 442-8.
8. Li P., Lai X., Witzmann F.A., Blazer-Yost B.L. Bioinformatic analysis of differential protein expression in Calu-3 cells exposed to carbon nanotubes. *Proteomes*. 2013; 1 (3): 219-39.
9. Shipelin V.A., Shumakova A.A., Masyutin A.G., Chernov A.I., Sidorova Yu.S., Gmshinski I.V. et al. In vivo subacute oral toxicity assessment of multiwalled carbon nanotubes: characteristic of nanomaterial and in-

- tegral indicators. *Nanotechnologies in Russia*. 2017; 12(9-10): 559-568. Doi: 10.1134/S199507801705010X
10. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 199n of 01/01/2016 “On approval of the rules of good laboratory practice”.
11. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press. 2011.
12. Loskutova L.V., Dubrovina N.I., Markel' A.L. Comparative analysis of the persistence of a conditioned passive avoidance reflex in rats with different forms of inherited hypertension. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2007; 37 (6): 577-82.
13. Razygraev A.V. Method for determination of glutathione peroxidase activity using hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2004; 4: 19-22. (In Russian)
14. Golubkina N.A. Fluorimetric method for the determination of selenium. *Zhurn. analiticheskoy khimii*. 1995; 50(8): 492-497. (In Russian)
15. Udall J.N., Pang K., Fritze L., Kleinman R., Walker W.A. Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediat. Res.* 1981; 15(3): 241-4.
16. Polyoxyethylene (20) sorbitan monoesters of lauric, oleic, palmitic and stearic acid and triester of stearic acid. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO Food Additives Series. 1974; 5: 8. Электронный ресурс: <http://www.inchem.org>.
17. Ju L., Zhang W., Wang X., Hu J., Zhang Y.: Aggregation kinetics of SDBS-dispersed carbon nanotubes in different aqueous suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012; 409: 159-66.
18. Ferguson P.L., Chandler G.T., Templeton R.C., Demarco A., Scrivens W.A., Englehart B.A. Influence of sediment-amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel shoot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42 (10): 3879.
19. Gorsheneva E.B. Dose-dependent effect of multi-walled carbon nanotubes and soot particles when administered orally to laboratory mice. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya*. 2014; 6(18): 48-55. (In Russian)
20. Chen G., Chen R., Zou C., Yang D., Chen Z-S. Fragmented polymer nanotubes from sonication-induced scission with a thermo-responsive gating system for anti-cancer drug delivery. *J. Mater. Chem. B*. 2014; 10(2): 1327-34.
21. Zaragoza-Contreras E.A., Lozano-Rodríguez E.D., Román-Aguirre M., Antunez-Flores W., Hernández-Escobar C.A., Flores-Gallardo S.G. et al. Evidence of multi-walled carbon nanotube fragmentation induced by sonication during nanotube encapsulation via bulk-suspension polymerization. *Micron*. 2009; 40 (5–6): 621-7.
22. Shumakova A.A., Gmshinsky I.V., Shipelin V.A., Rezaeva D.M., Khotimchenko S. A. Effect of multiwalled carbon nanotubes on the microelement status in the internal organs of rats in an experiment. *Nanotechnologies in Russia*. 2018; 13 (3–4): 189–94.
23. Jachak A., Lai S.K., Hida K., Suk J.S., Markovic N., Biswal S., et al. Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes in human mucus. *Nanotoxicology*. 2012; 6 (6): 614-22.
24. Pauluhn J. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multi-walled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci.* 2010; 113(1): 226-42.
25. Zhang Z.P., Tian Y.H., Li R., Cheng X.Q., Guo S.M., Zhang J.X. et al. The comparison of the normal blood biochemical values of Wistar rats with different age and sex. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2004; 4: 215-8.