

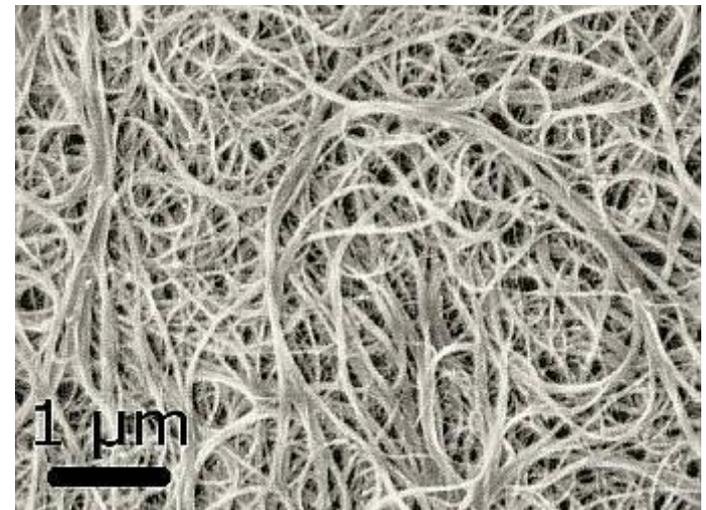
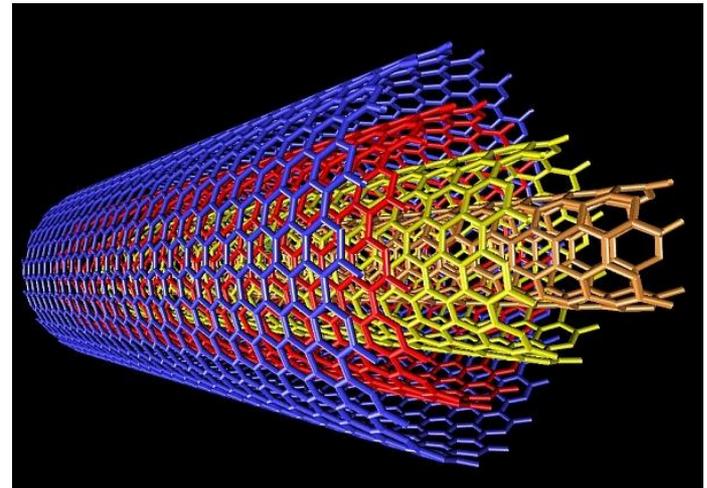


**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК
ПРИ ИХ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ
BIOLOGICAL ACTION OF CARBON NANOTUBES
ADMINISTERED ORALLY TO RATS**

В.А.Шипелин, А.А.Шумакова, И.В.Гмошинский, С.А.Хотимченко
V.A.Shipelin, A.A.Shumakova, I.V.Gmoshinski, S.A.Khotimchenko

*ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия
Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food
Safety, Moscow, Russia*

- **Углеродные нанотрубки** (УНТ) являются продуктом современных нанотехнологий, вызывающим исключительно большой интерес, как в плане своих уникальных физико-химических свойств, так и перспектив практического применения в промышленности и медицине.
- О популярности УНТ как объектов научного исследования свидетельствует тот факт, что первая работа, в которой сообщается о синтезе УНТ, была процитирована по данным Google **39890** раз по состоянию на 2015 г.
- УНТ являются крупнотоннажным продуктом нанотехнологического синтеза; их годовое производство в мире в 2015 г. составило от 3700 до 5700 тонн и может достичь **10500–12000** тонн в 2020 г.
- Ряд инновационных предприятий, специализирующихся по промышленному производству УНТ, функционируют в России.



Области применения УНТ включают:

- ❖ Композитные материалы
- ❖ Li-ионные батареи
- ❖ Изделия электроники
- ❖ Прозрачные токопроводящие покрытия,



а также:

- ❖ Новые формы агрохимикатов,
- ❖ Изделия медицинского назначения, включая импланты,
- ❖ Упаковочные материалы

Потенциальные области применения УНТ в производстве потребительской продукции и медицине весьма обширны, что указывает на быстрое увеличение контакта человека с ними в перспективе.

Углеродные нанотрубки: сценарии экспозиции



Ингаляция
(преимущественно на
производстве)

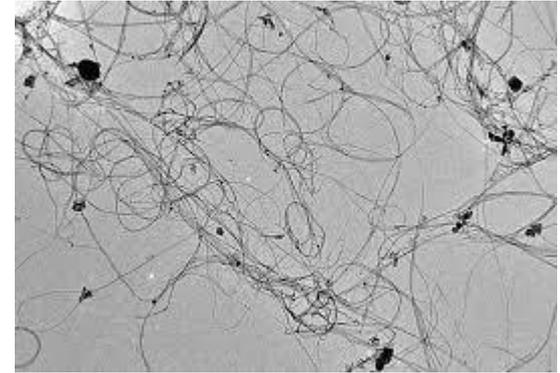


Перорально: в составе
контаминированной с/х
продукции, миграция из
упаковки



Через кожу:
упаковочные
материалы,
косметика

В широких межлабораторных исследованиях, проведенных в России, США, Нидерландах и др. странах получены надёжные данные о содержании УНТ в воздухе производственных помещений, позволяющие, в сочетании с большим объёмом данных об ингаляционной токсичности УНТ, перейти к вопросу их гигиенического нормирования.



В настоящее время международно-признанным является рекомендуемый US NIOSH безопасный уровень (ПДК) для МУНТ в воздухе рабочей зоны, составляющий 1 мкг/м³.

Токсичность УНТ при других возможных путях поступления, в том числе пероральном, изучена НЕДОСТАТОЧНО

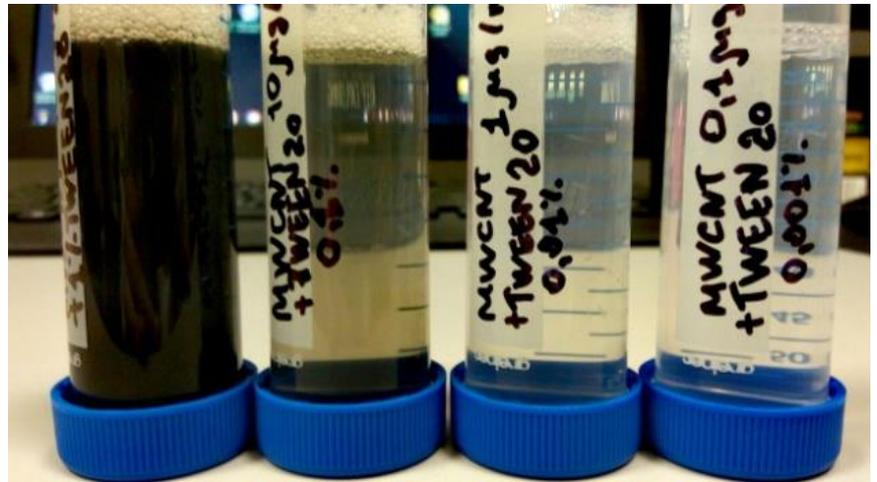


Цель исследования:

Разработка метода введения углеродных нанотрубок (МУНТ и ОСУНТ) лабораторным животным с потребляемой водой в течение длительного подострого и (в перспективе) хронического эксперимента и оценка ряда показателей и маркеров, характеризующих токсическое действие УНТ на организм при таком пути поступления.

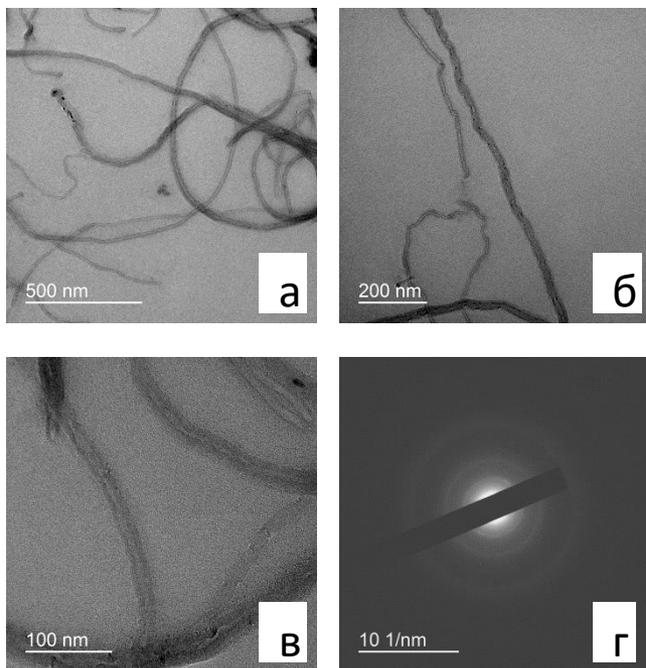
МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ:

Обработка ультразвуком в присутствии 1% по объёму поверхностно-активного вещества (ПАВ) «Твееп-20», являющегося разрешенной пищевой добавкой (E433).

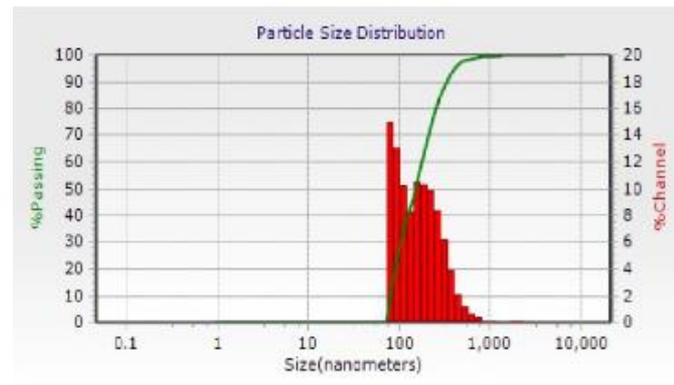


Характеристика дисперсии наноматериала («Таунит-М»[®])

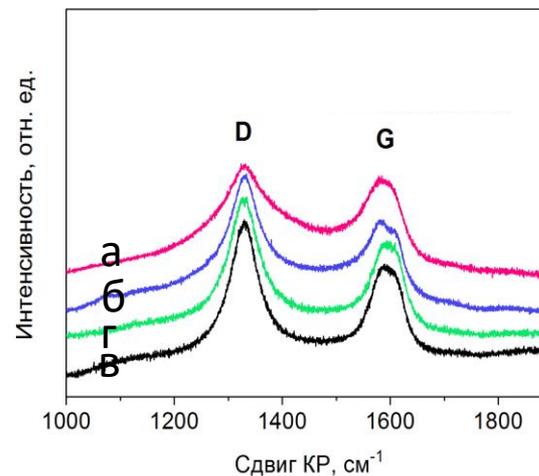
ПЭМ



ДРС



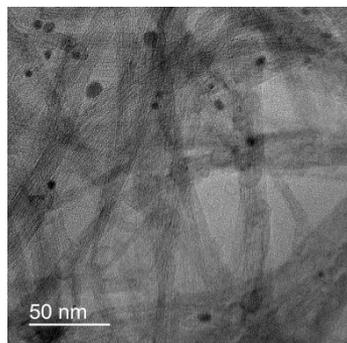
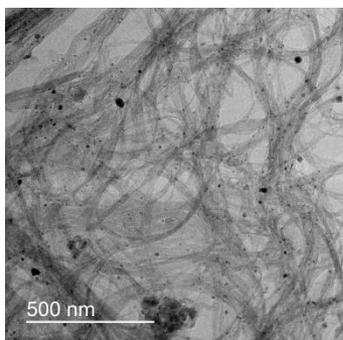
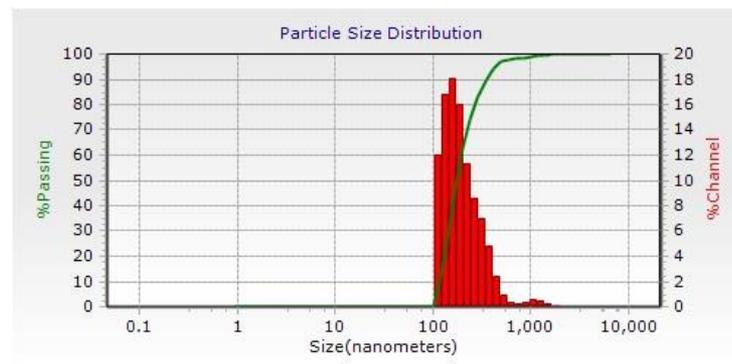
КР



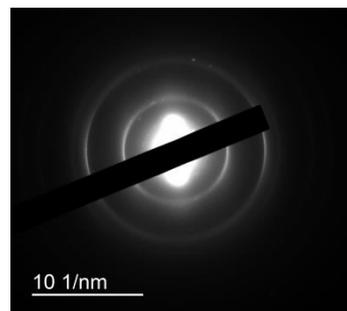
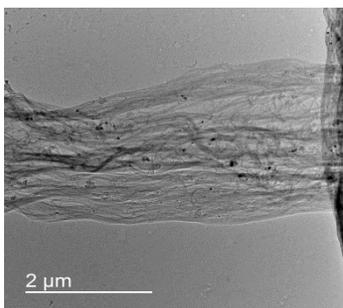
© А.И. Чернов, Е.Д. Образцова. ФГБУН. «Институт общей физики им. А.М.Прохорова» РАН
© А.Г.Масютин. Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова

Характеристика дисперсии наноматериала («ОСУНТ-90Т»[®])

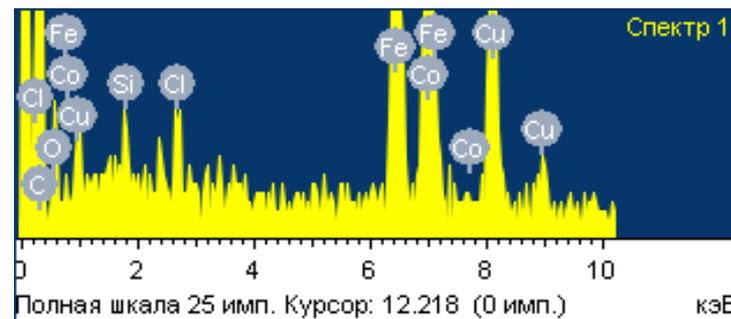
ДРС



ПЭМ

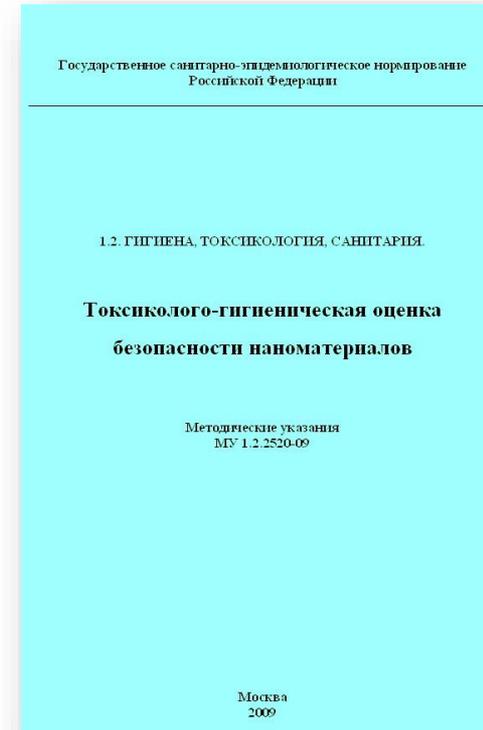


ЭДС

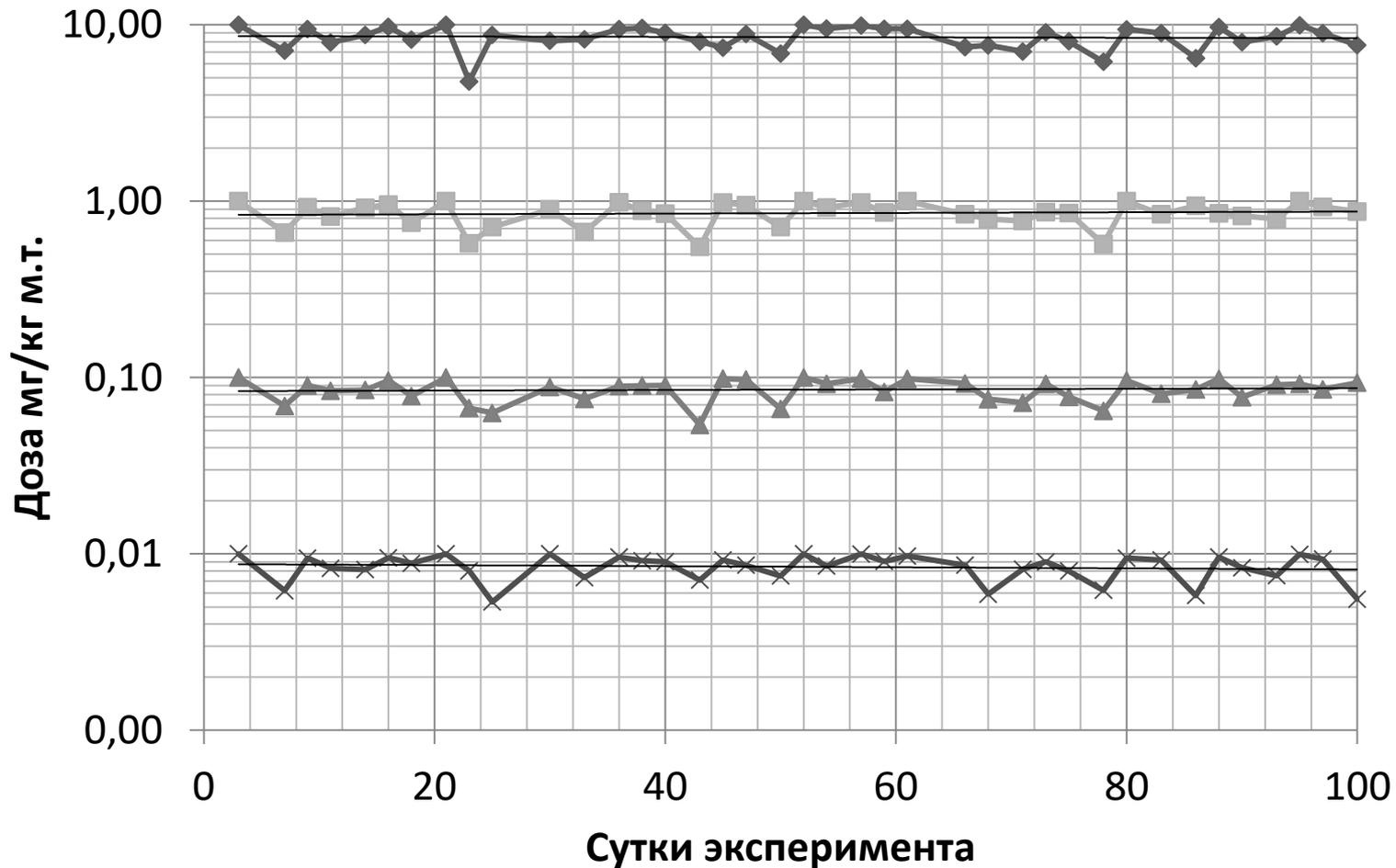


Дизайн экспериментов

- ❑ 5 групп по 15 крыс самцов линии «Вистар» исходной массой 80 г
- ❑ Дозы МУНТ и ОСУНТ (мг/кг массы тела):
 - ✓ **Группа 1 – 0 (контроль, введение носителя- раствора ПАВ)**
 - ✓ **Группа 2 – 0,01**
 - ✓ **Группа 3 – 0,1**
 - ✓ **Группа 4 – 1,0**
 - ✓ **Группа 5 – 10**
- ❑ Введение наноматериала: с питьевой водой в режиме неограниченного доступа
- ❑ Определяемые показатели:
 - ✓ Прирост массы тела, относительная масса внутренних органов
 - ✓ Поведенческие реакции (УРПИ)
 - ✓ Гематологические исследования
 - ✓ Биохимические исследования
 - ✓ Оценка повреждения ДНК
 - ✓ Проницаемость кишечного барьера
 - ✓ Микробиологические исследования
 - ✓ Апоптоз клеток печени

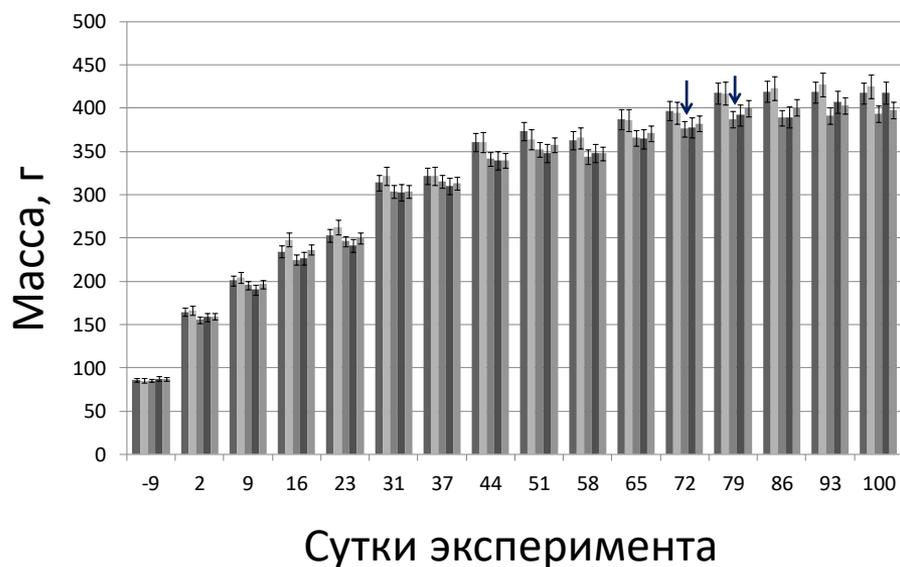


Потребление МУНТ с питьевой водой в ходе эксперимента



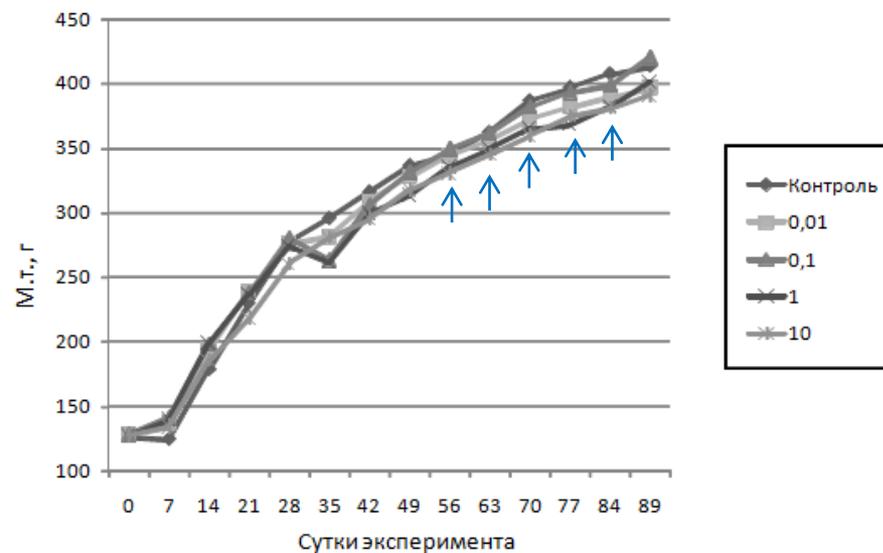
Отставание в прибавке массы тела

МУНТ



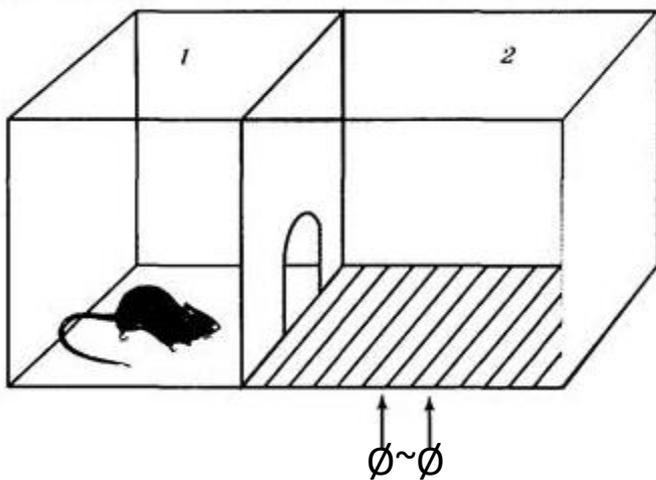
↓ $p < 0,05$ при сравнении с группой 1 для группы 3 (0,1 мг/кг м.т.)

ОСУНТ



↓ $p < 0,05$ при сравнении с группой 1 для группы 4 (1 мг/кг м.т.)

Тестирование когнитивной функции



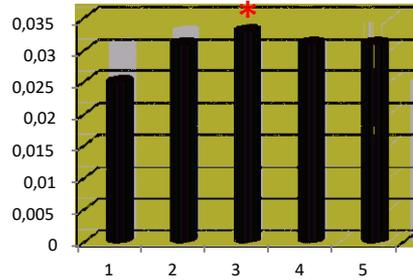
Изучение когнитивной функции (состояния краткосрочной и долгосрочной памяти) по методу УРПИ (**условный рефлекс пассивного избегания**) не выявили достоверного влияния ОСУНТ и МУНТ на эти показатели



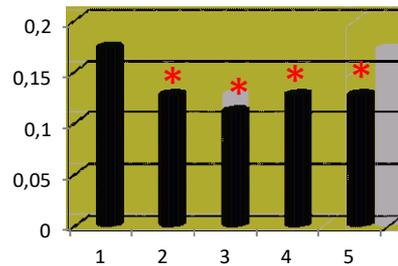
Относительная масса органов

МУНТ

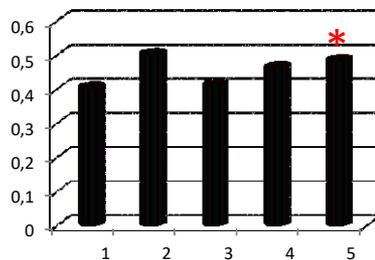
Надпочечники



Тимус



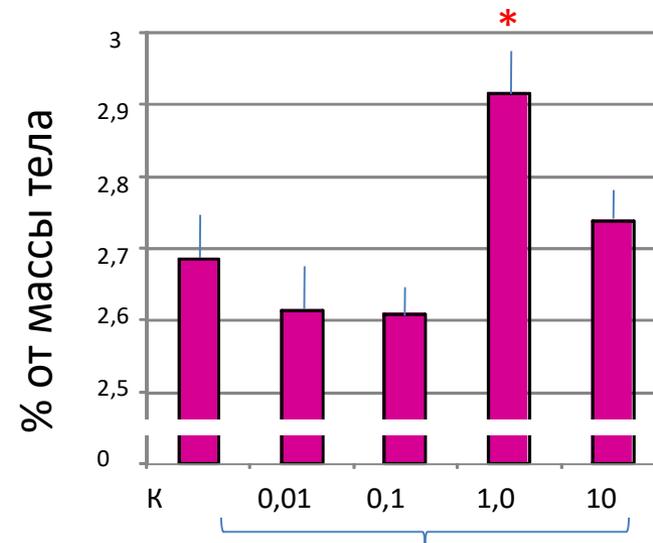
Головной мозг



Группы

ОСУНТ

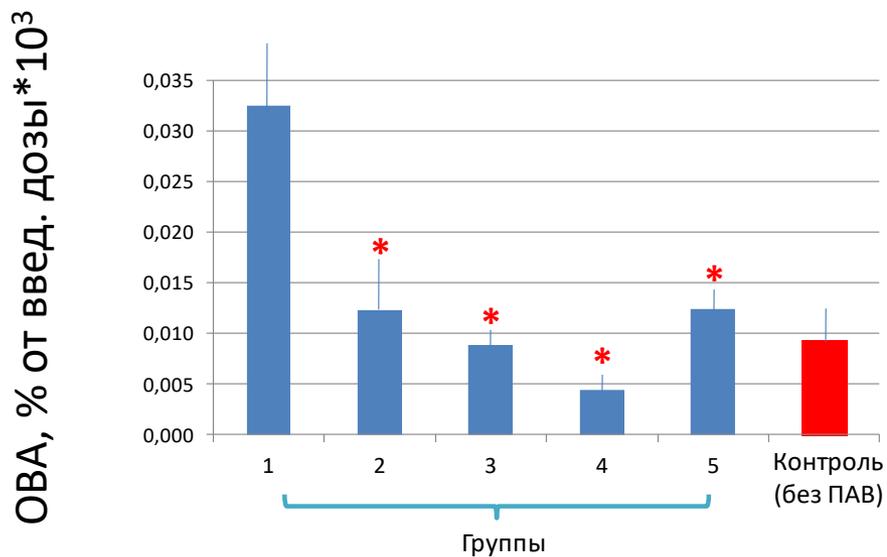
Печень



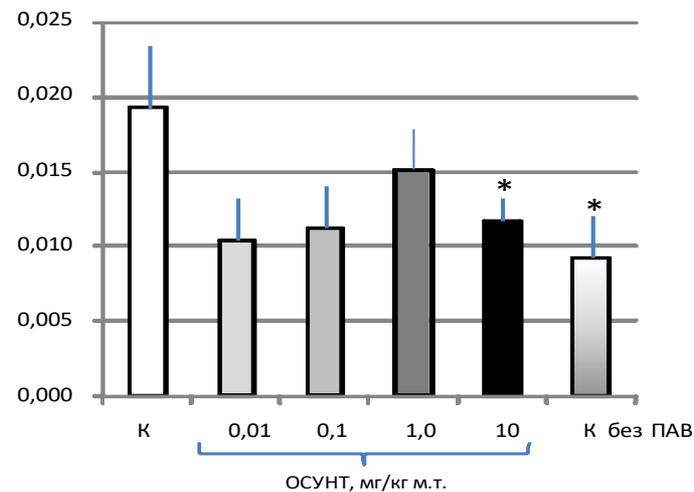
* $P < 0,05$ при сравнении с группой 1

Проницаемость кишечного барьера для макромолекул белка (куриного овальбумина)

МУНТ



ОСУНТ



$p < 0,05$ при сравнении с группой 1

*

Биохимия (кровь)

МУНТ

Показатели	Доза МУНТ, мг/кг м.т.
↑ Глюкоза	0,01
↑ Креатинин	0,01

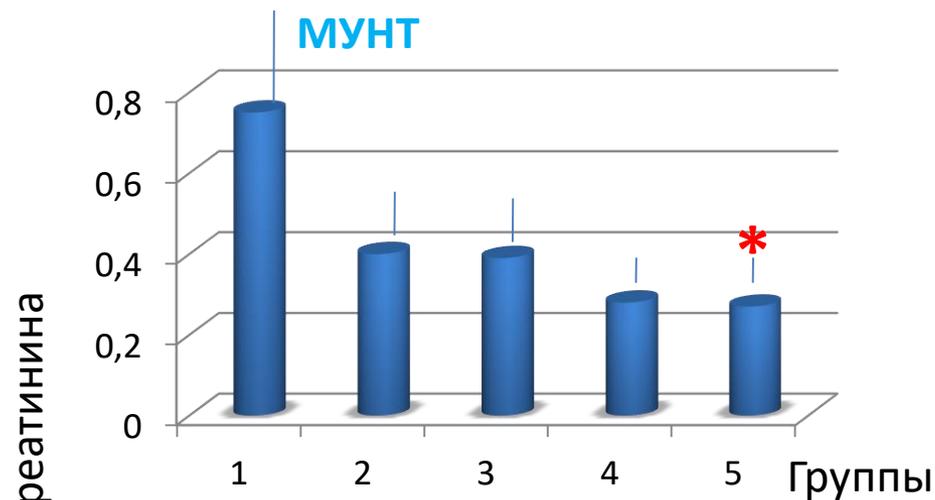
ОСУНТ

Показатели	Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.
↓ Холестерин	0,01; 0,1
↓ Триглицериды	10,0
↑ Мочевая кислота	1,0

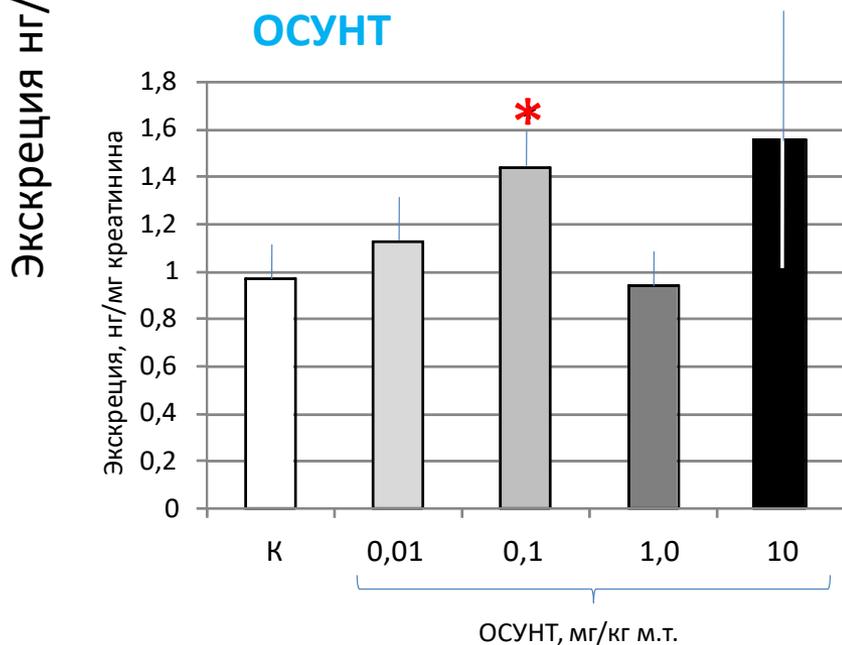


Величина и/или направленность биохимических эффектов ОСУНТ и МУНТ не позволили однозначно идентифицировать их как вредные (токсические)

Экскреция с мочой 8-оксо-2-дезоксигуанозина (8-охо-G)



(8-охо-G) –
биохимический маркер
окислительного
повреждения ДНК



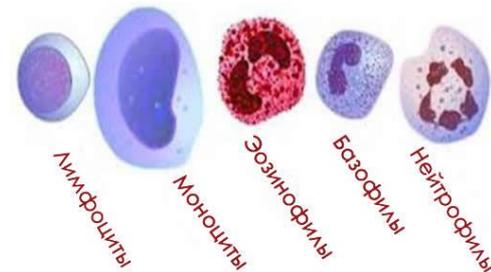
Введение МУНТ и ОСУНТ
характеризовалось
разнонаправленными измерениями
экскреции 8-охо-G

* $P < 0,05$ при сравнении с группой 1

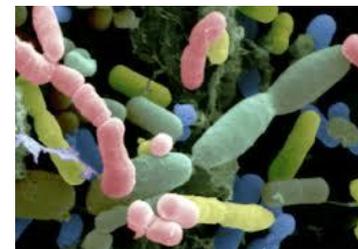
Гематологические показатели

Показатели	МУНТ		ОСУНТ	
	Направленность изменения	Доза, мг/кг м.т.	Направленность изменения	Доза, мг/кг м.т.
Нейтрофилы	↓	0,1; 1,0	↓	10
Лимфоциты	↑	0,1- 10,0	↑	10
Моноциты	↓	0,01- 1,0	↓	0,1
Тромбоциты	↓	0,01; 1,0	↓	10*

* Средний объём тромбоцита



Микробиота слепой кишки (МУНТ)

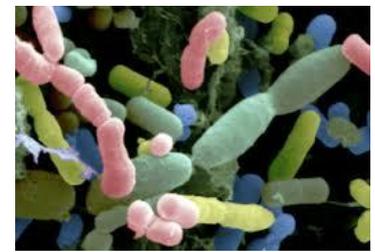


Показатели	Группы (N=6)					p** для групп 1-5
	1	2	3	4	5	
Доза МУНТ, мг/кг м.т.	0	0,01	0,1	1,0	10	
Содержание, lg КОЕ/г, M±m						
Бифидобактерии	8,17±0,31	6,83±0,31* ↓	7,67±0,33	7,33±0,49	7,67±0,21	>0,1
Лактобациллы	8,39±0,29	8,11±0,28	8,55±0,14	8,27±0,29	8,12±0,17	>0,1
Бактероиды	6,50±0,13	6,85±0,15	7,01±0,24	6,73±0,38	6,57±0,17	>0,1
Энтеробактерии	7,07±0,24	6,55±0,26	6,73±0,26	6,22±0,44	6,37±0,31	>0,1
Энтерококки	6,77±0,34	6,46±0,13	7,58±0,50	6,76±0,42	6,87±0,12	>0,1
ЦА-энтеробактерии	6,21±0,16	6,80±0,14* ↑	6,50±0,17	6,00±0,43	5,80±0,33	0,021
Стафилококки	5,94±0,50	6,07±0,28	6,78±0,61	6,18±0,67	6,37±0,46	>0,1
Аэробы гемолитич.	7,49±0,33	7,25±0,25	7,72±0,23* ↑	7,31±0,30	7,39±0,34	>0,1
Анаэробы гемолитич.	6,79±0,07	7,20±0,55	7,53±0,31	7,00±0,36	6,73±0,12	>0,1
Дрожжи	3,70±0,74	4,70±0,53	6,13±0,34* ↑↑	5,22±0,42	4,93±0,50	0,046
Содержание, lg КОЕ/г, медиана (интервал изменения)						
Плесени	3,04 (2,30-3,78)	2,3 (2,30-3,30)	2,6 (2,30-3,00)	2,3 (2,30-4,18)	2,3 ↓ (2,30-2,30)*	>0,1

* P<0,01 при сравнении с группой 1

** Критерий ANOVA /Краскала-Уоллеса для групп 1-5

Микробиота слепой кишки (ОСУНТ)



Показатели	Группы (N=6)					p** для групп 1-5
	1	2	3	4	5	
Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.	0	0,01	0,1	1,0	10	
Содержание, lg КОЕ/г , М±m						
Бифидобактерии	7,67±0,33	8,17±0,31	7,67±0,33	8,67±0,33	7,83±0,31	>0,1
Лактобациллы	7,92±0,29	8,15±0,21	8,39±0,17	8,50±0,07	8,23±0,31	>0,1
Бактероиды	6,65±0,24	6,75±0,15	6,40±0,05	6,54±0,19	6,30±0,00	>0,1
Энтеробактерии	6,19±0,24	7,27±0,21	6,88±0,55	6,48±0,35	6,69±0,32	>0,1
Энтерококки	6,45±0,28	7,01±0,18	6,78±0,20	6,05±0,31	6,58±0,30	>0,1
ЦА-энтеробактерии	6,58±0,49	7,31±0,31	7,08±0,49	6,86±0,28	6,95±0,40	>0,1
Стафилококки	6,33±0,18	5,67±0,69	6,22±0,07	6,38±0,16	6,35±0,20	>0,1
Дрожжи	5,72±0,30	6,12±0,37	6,68±0,24*	6,32±0,24	5,94±0,39	>0,1
Плесени	4,41±0,37	3,07±0,29*	3,21±0,42*	2,58±0,14*	2,35±0,05*	<0,001

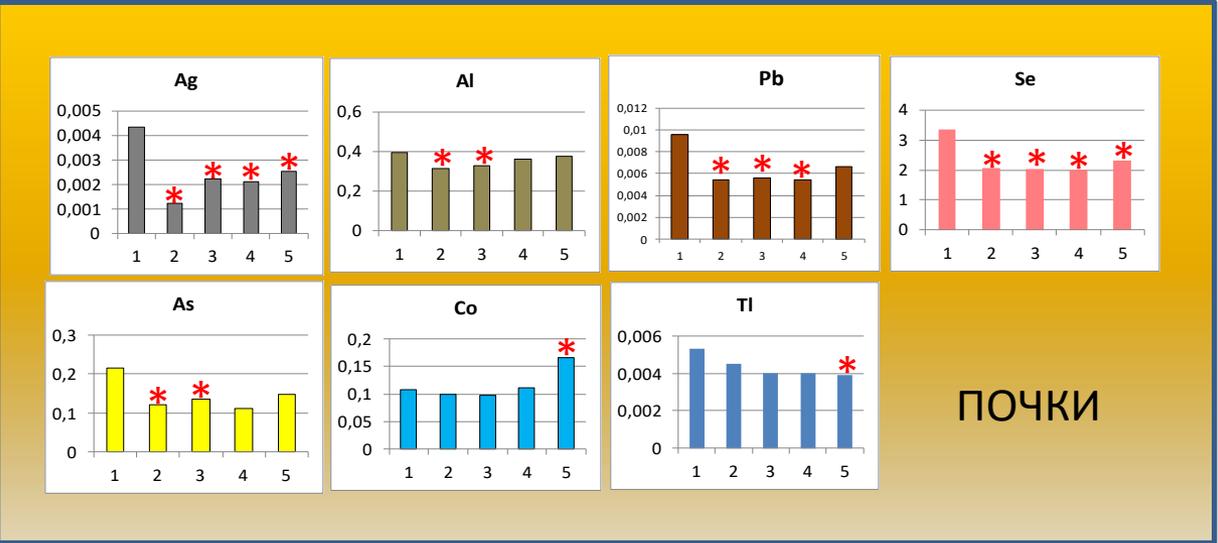
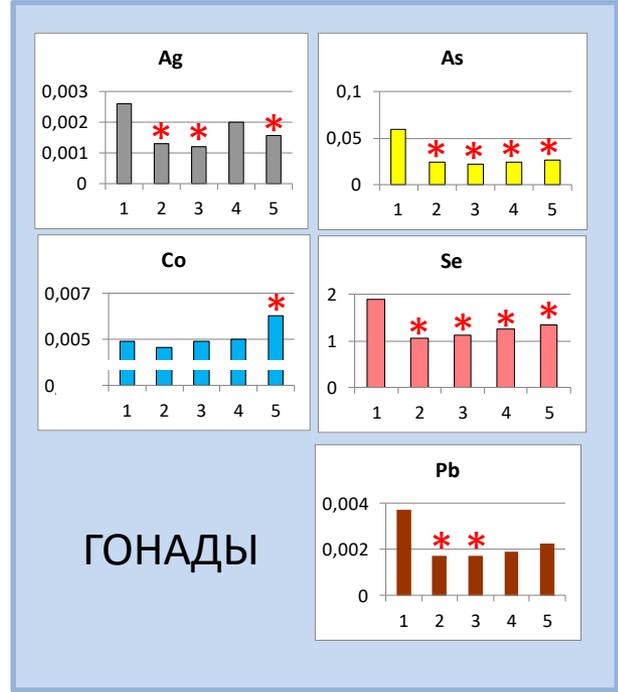
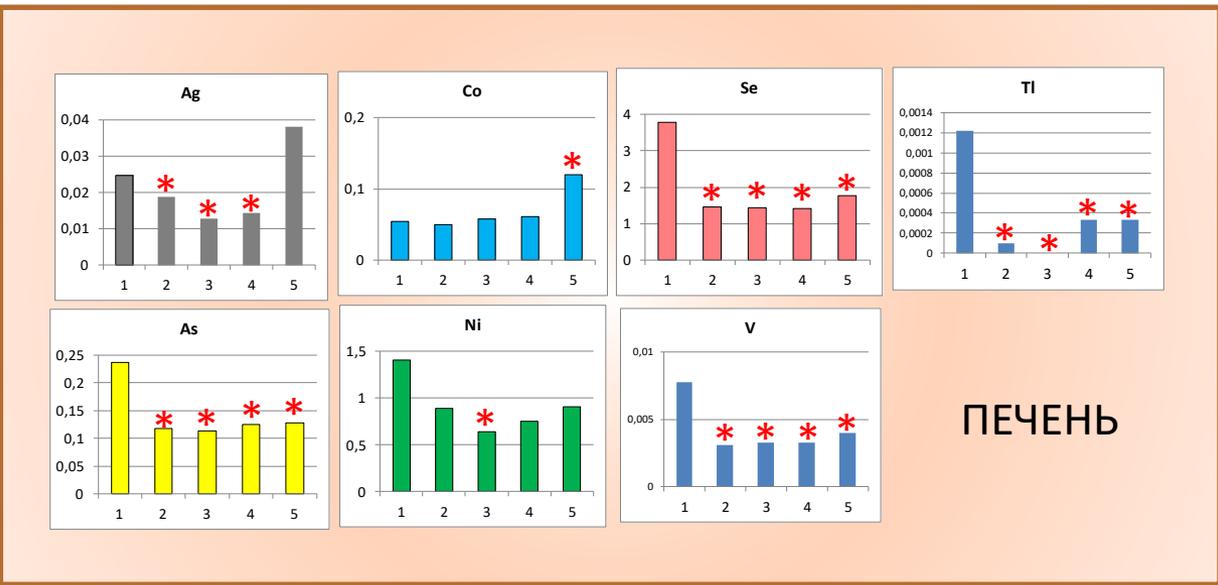
* P<0,01 при сравнении с группой 1

** Критерий ANOVA /Краскала-Уоллеса для групп 1-5

ОСУНТ и МУНТ сходным образом **стимулируют** рост факультативной **дрожжевой** микрофлоры и **подавляют** рост **плесеней**, однако эти эффекты максимально проявляются при разных дозах

Влияние на гомеостаз микроэлементов (МУНТ)

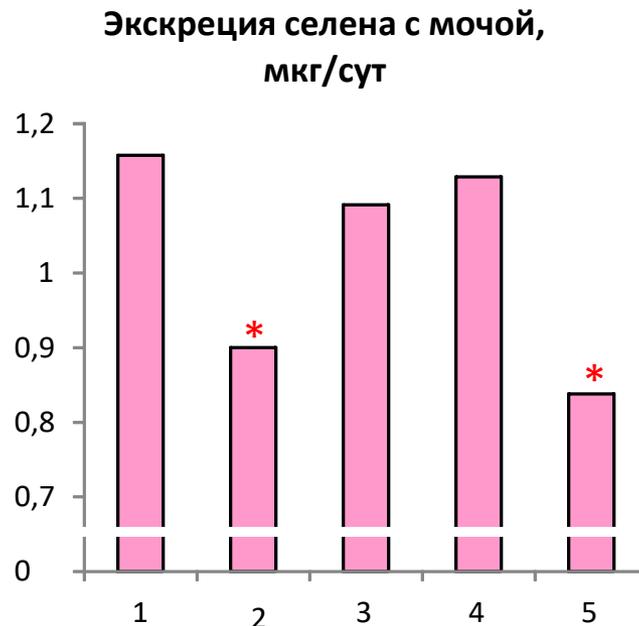
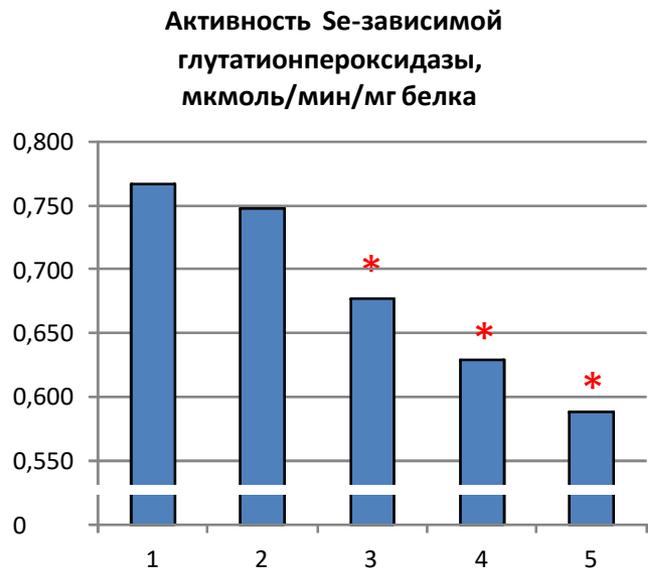
Группы: 1 – контроль
 2 – 0,01 мг/кг; 3 – 0,1 мг/кг; 4 – 1,0 мг/кг; 5 – 10 мг/кг
 * - различие с группой 1 достоверно, $p < 0,05$



❑ Выявлено снижение содержания во всех органах **селена, мышьяка, серебра**, повышение- **кобальта**.
 ❑ За исключением кобальта (входящего в состав металлического катализатора) однозначной зависимости эффектов от дозы МУНТ не было

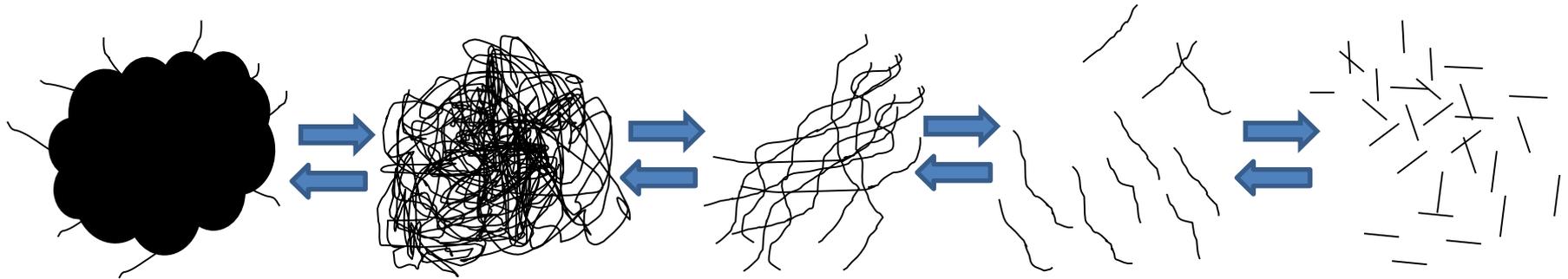
Влияние ОСУНТ на статус селена (предварительные данные)

Группы: 1 – контроль
2 – 0,01 мг/кг; 3 – 0,1 мг/кг; 4 – 1,0 мг/кг; 5 – 10 мг/кг
* - различие с группой 1 достоверно, $p < 0,05$



Снижение обеспеченности **селеном**, в том числе его содержания в гонадах у животных, получавших МУНТ, является, возможно, одной из причин снижения фертильности самцов грызунов, получающих нанотрубки перорально (Васюкова И.А., Гусев А.А., Халиуллин Т.О., Фатхутдинова Л.М. и др., 2014, 2015)

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ И ПРОБЛЕМА ДОЗИМЕТРИИ В НАНОТОКСИКОЛОГИИ



- ❑ Действующая доза наноматериала, в общем случае, **должна** определяться не через массовую концентрацию, а через число индивидуальных частиц (Oberdörster G., et al., 2007)
- ❑ Для нанотрубок по мере снижения их массовой концентрации может повышаться количество индивидуальных частиц (коротких отломков трубок), в наибольшей степени проникающих через биологические барьеры и захватываемых живыми клетками
- ❑ Определить экспозиционную дозу индивидуальных УНТ можно относительно легко в газовой фазе (при аэрозольной экспозиции), однако в конденсированных средах (особенно в биологическом окружении) это связано с рядом методических проблем и неопределённостей

❑ В результате 3-месячного воздействия МУНТ и ОСУНТ, вводимых с питьевой водой, на организм крыс, выявлены изменения ряда интегральных, биохимических, микро-экологических, микроэлементных, гематологических показателей организма. Часть из этих воздействий могут быть интерпретированы как вредные (токсические)

❑ Стандартные методы нормирования вредных химических факторов, по-видимому, ограниченно применимы к МУНТ и ОСУНТ, поскольку зависимость их вредного (токсического) действия от дозы в большинстве случаев имеет немонотонный характер (эффекты в большей степени проявляются при малых дозах, чем при больших)

❑ С учётом выявленных неблагоприятных эффектов в 3-месячном подостром эксперименте **безопасная доза** МУНТ и ОСУНТ составляет, по-видимому, **менее 0,1 мг/кг массы тела**

ВЫВОДЫ



Благодарности



Авторы благодарят коллег, предоставивших данные своих экспериментов для доклада:

□ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»:

❖ проф. С.А.Шевелева, И.Б.Быкова, Н.Р.Ефимочкина, Ю.М. Маркова, О.К. Мустафина, Т.В. Пичугина, А.С. Полянина, Н.А.Ригер, А.В. Селифанов, Ю.С.Сидорова, Х.С. Сото, Э.Н. Трушина

□ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова:

❖ проф. Г.Е.Онищенко, А.Г.Масютин

□ ФГБУН «Институт общей физики им. А.М.Прохорова» РАН:

❖ Е.Д. Образцова, А.И. Чернов

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы поисковых научных исследований (тема ФАНО России № 0529-2014-0053).



**Благодарим за
внимание!**