

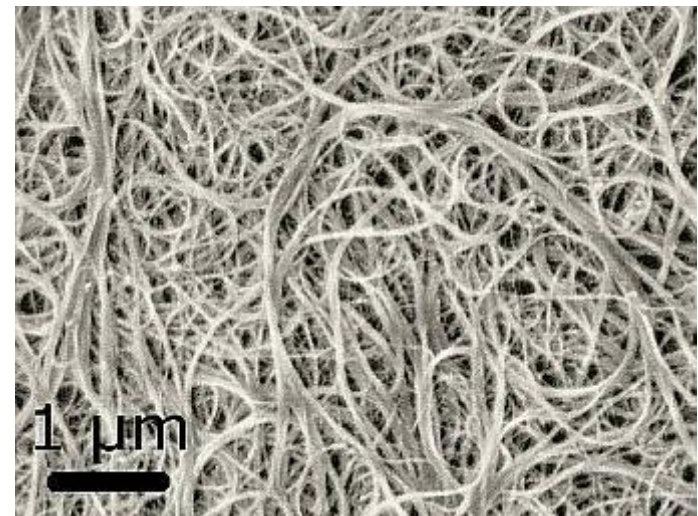
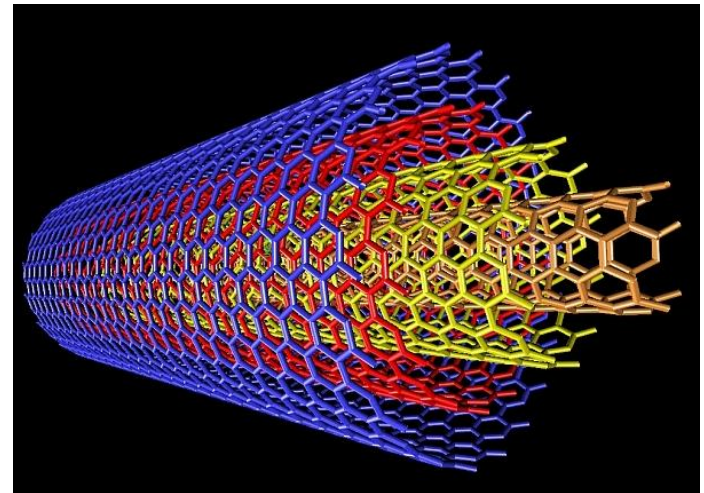


**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК  
ПРИ ИХ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ  
BIOLOGICAL ACTION OF CARBON NANOTUBES  
ADMINISTERED ORALLY TO RATS**

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)



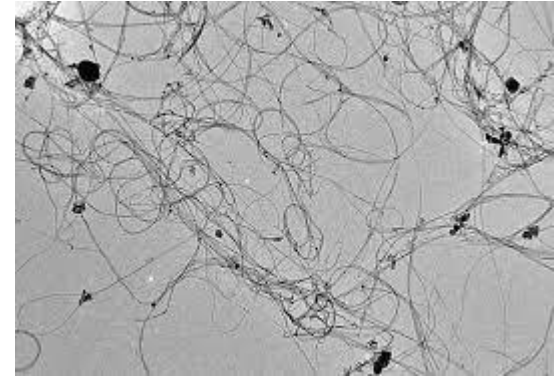
Перорально: в составе  
контаминированной с/х  
продукции, миграция из  
упаковки



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/м<sup>3</sup>.**

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

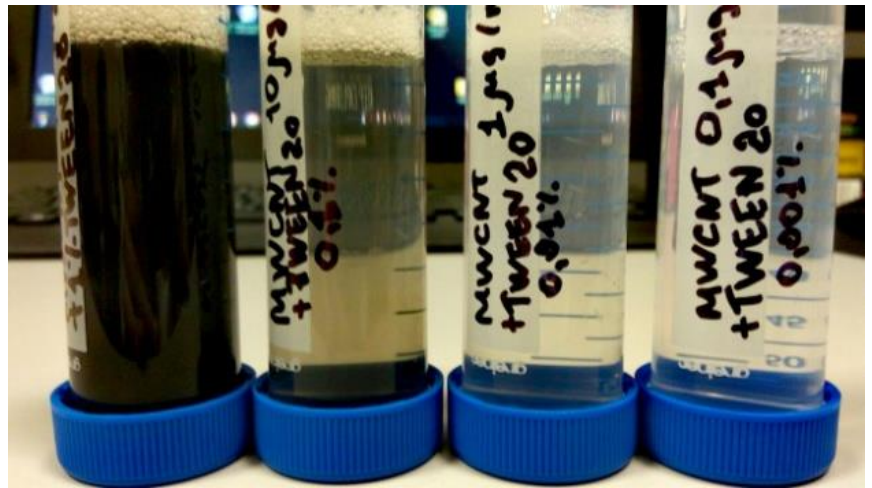


# Цель исследования:

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.

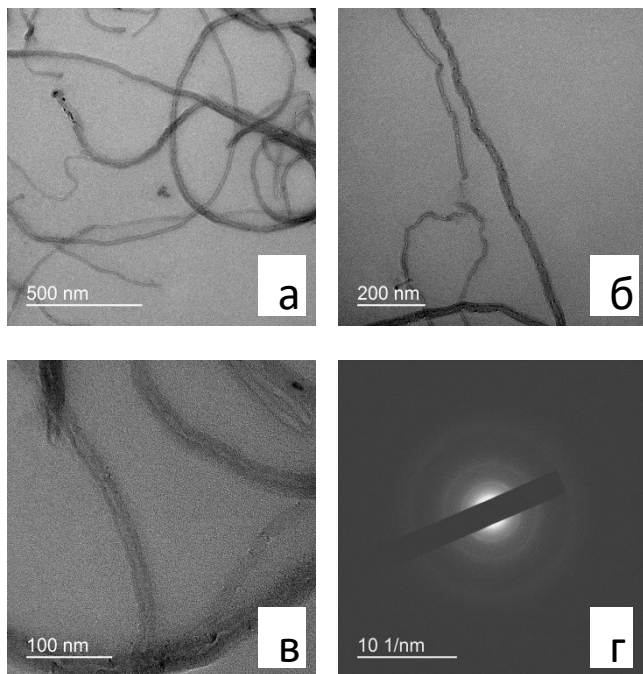
## МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ:

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

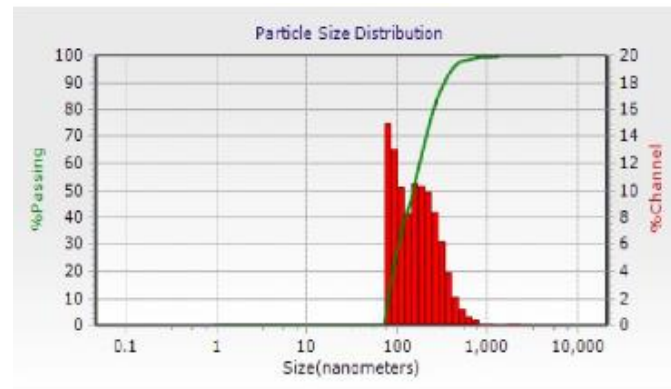


# Характеристика дисперсии наноматериала («Таунит-М»<sup>®</sup>)

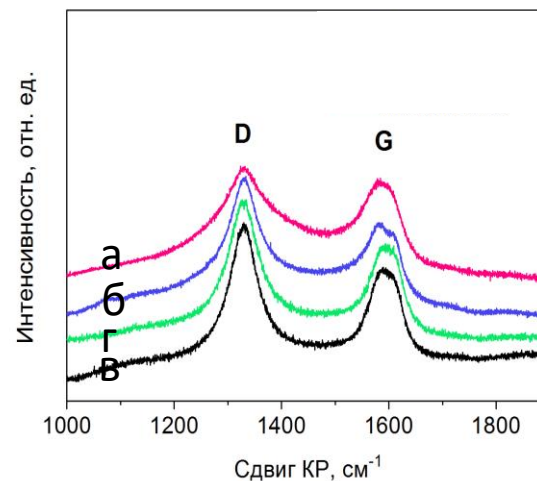
ПЭМ



ДРС



КР

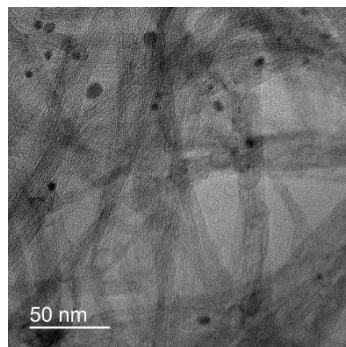
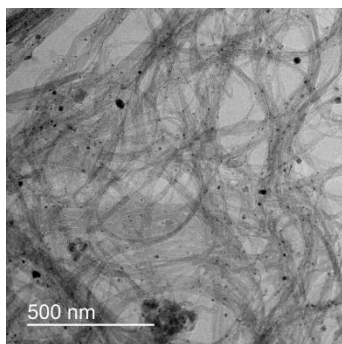
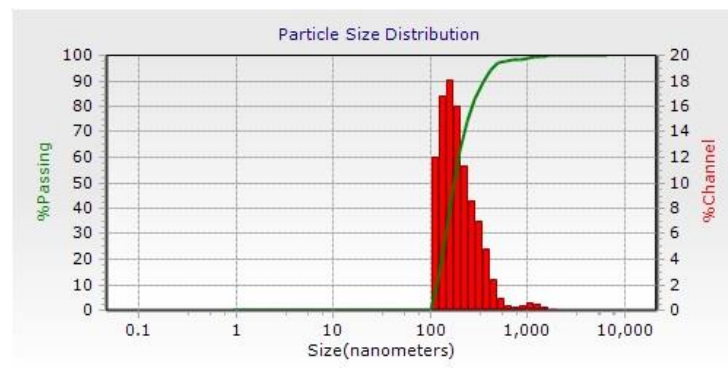


© А.И. Чернов, Е.Д. Образцова. ФГБУН. «Институт общей физики им. А.М.Прохорова» РАН  
© А.Г.Масютин. Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова

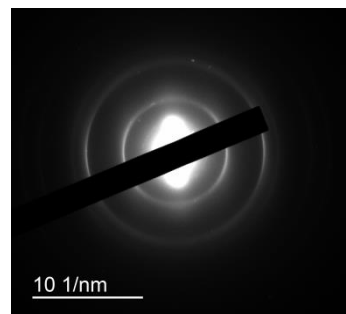
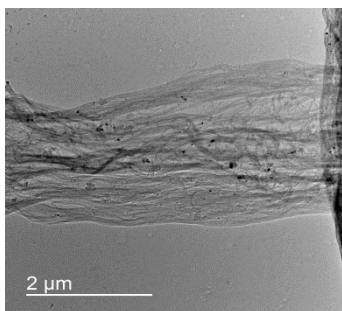


# Характеристика дисперсии наноматериала («ОСУНТ-90Т»<sup>®</sup>)

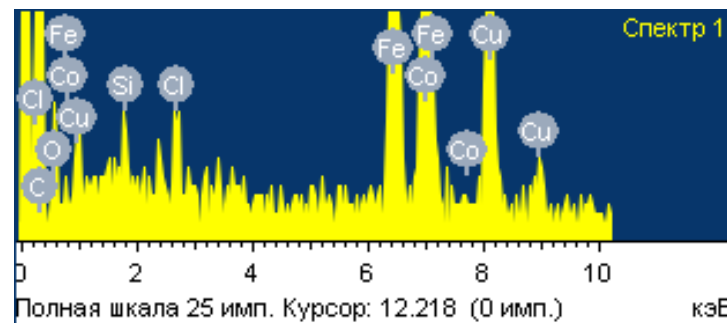
ДРС



ПЭМ

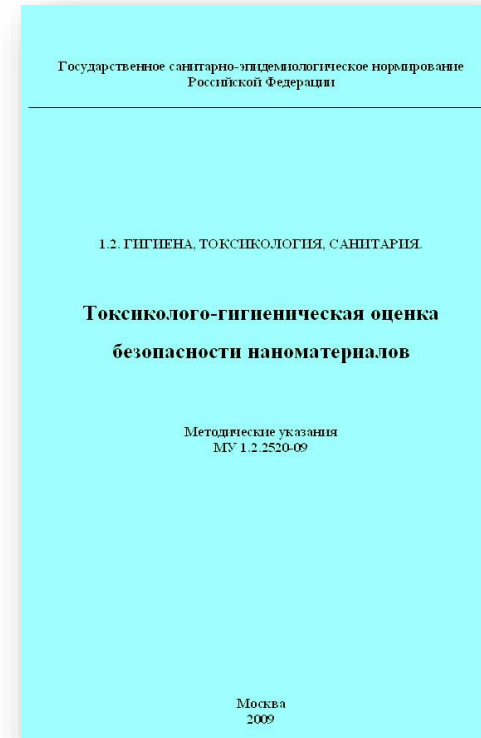


ЭДС

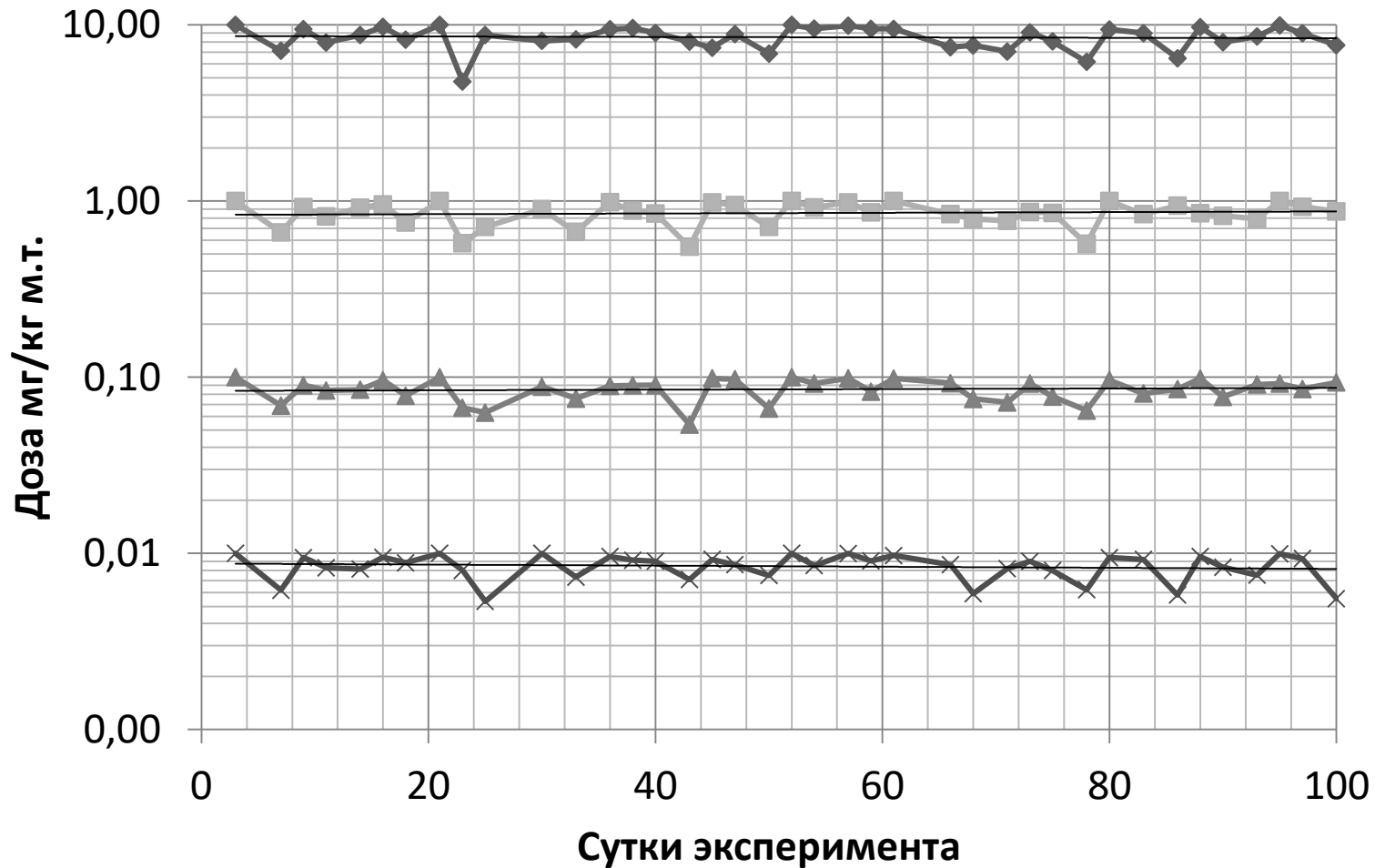


# Дизайн экспериментов

- ❑ 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

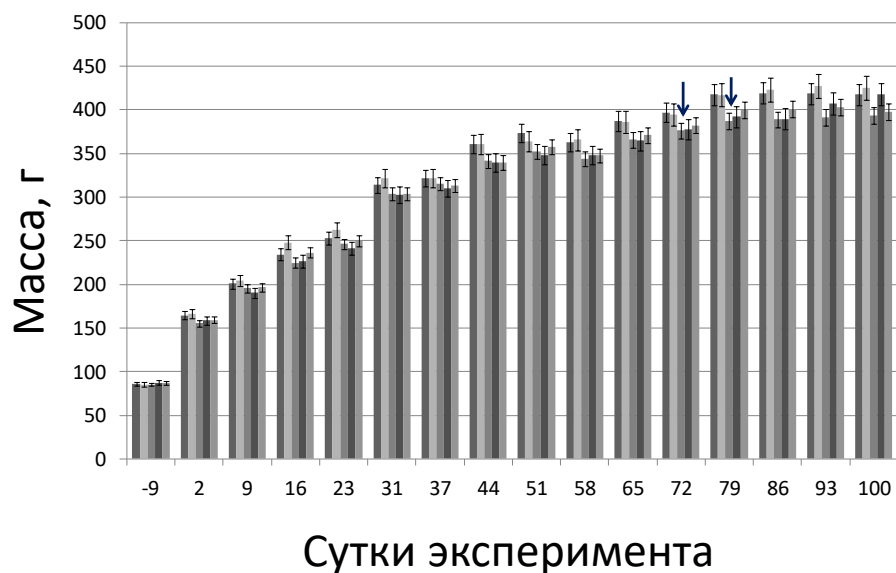


# Потребление МУНТ с питьевой водой в ходе эксперимента

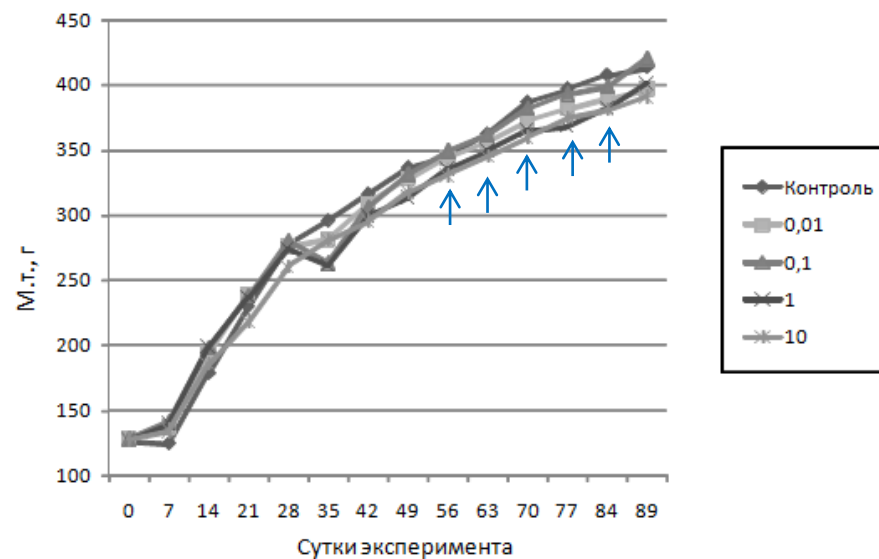


# Отставание в прибавке массы тела

МУНТ



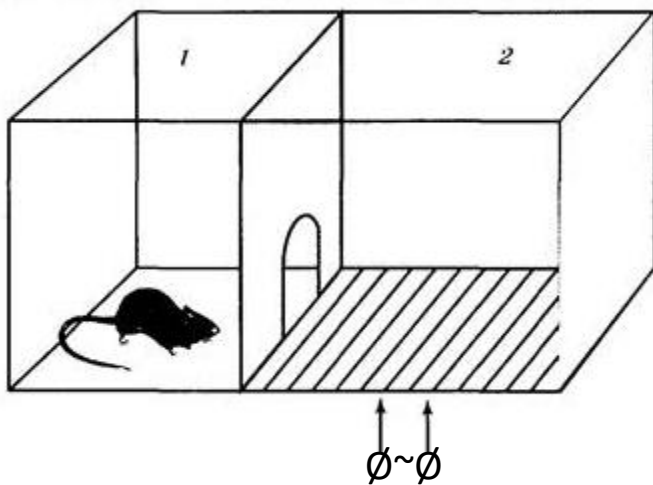
ОСУНТ



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

↓  $p < 0,05$  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

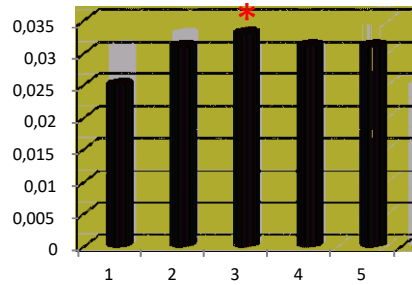




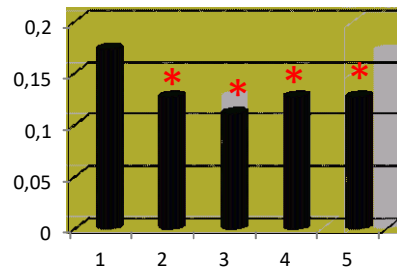
# Относительная масса органов

## МУНТ

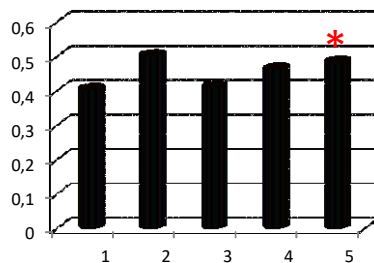
Надпочечники



Тимус

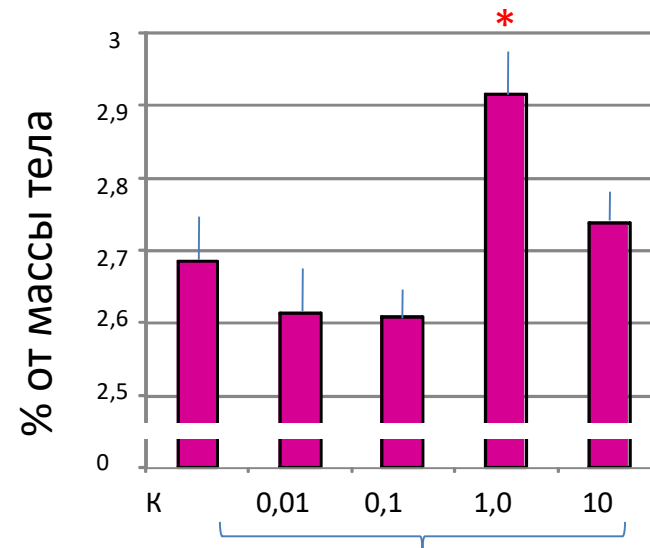


Головной мозг



## ОСУНТ

Печень



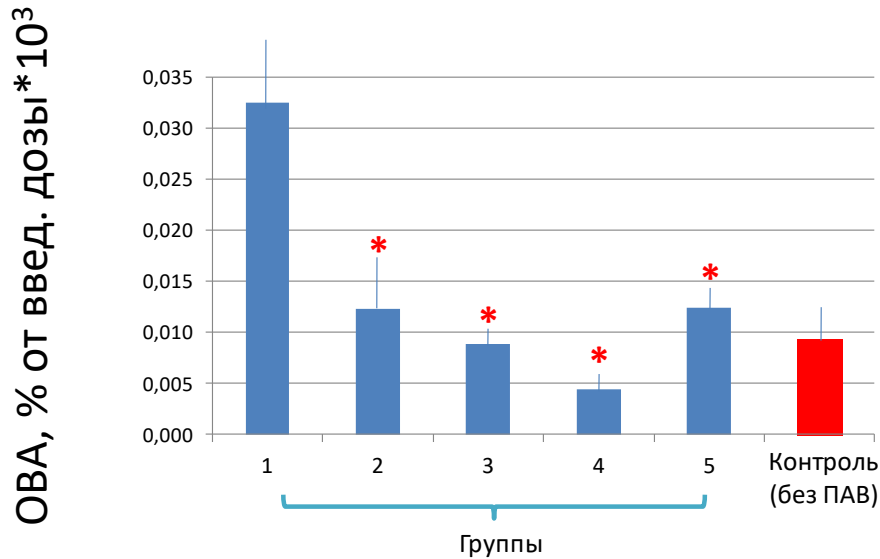
% от массы тела

Группы

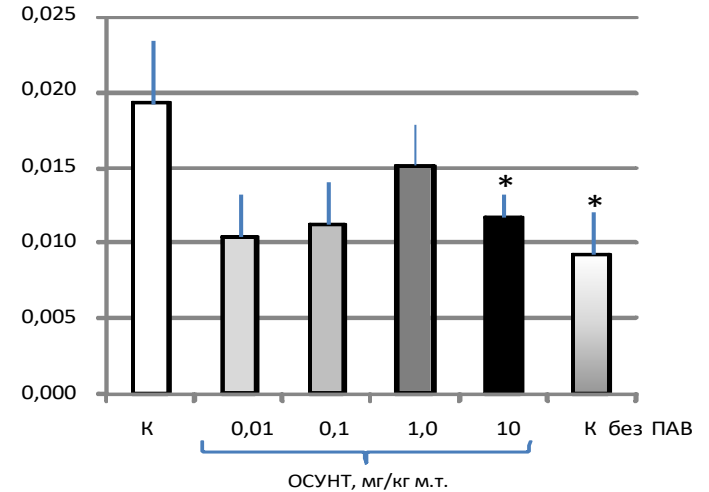
\*  $P < 0,05$  при сравнении с группой 1

# 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                  |

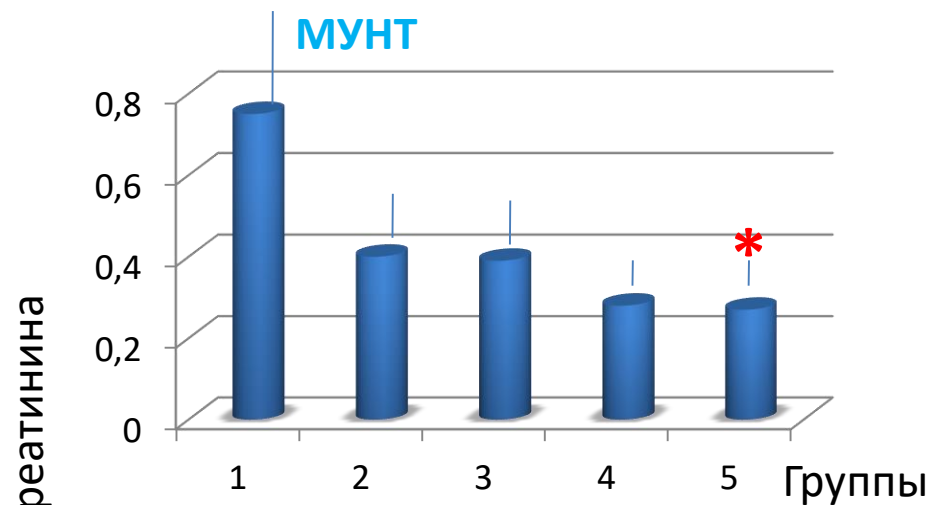
## ОСУНТ

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

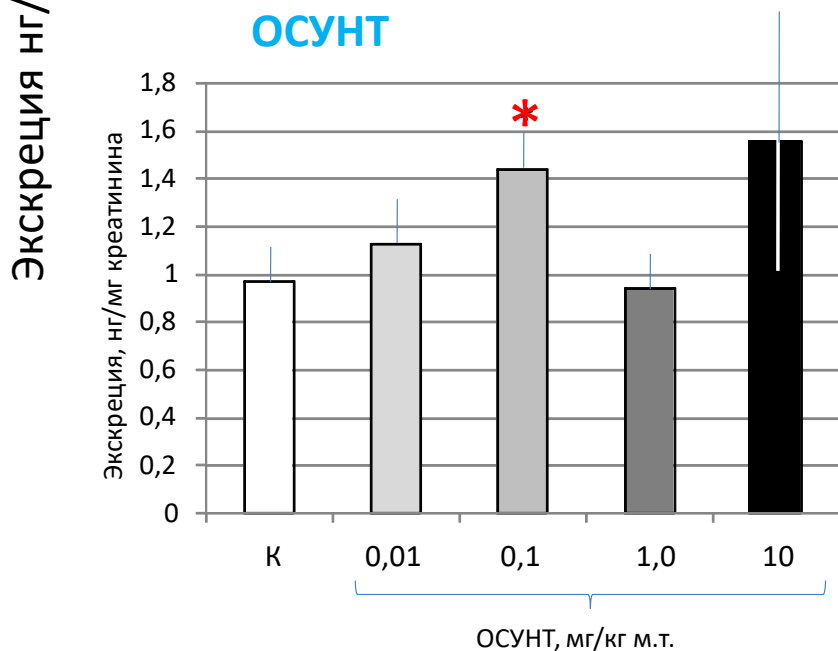


**Величина и/или направленность биохимических эффектов ОСУНТ и МУНТ не позволили однозначно идентифицировать их как вредные (токсические)**

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



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



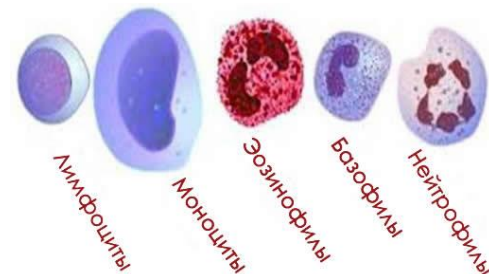
Введение МУНТ и ОСУНТ  
характеризовалось  
разнонаправленными измерениями  
экскреции 8-охо-G

\*  $P < 0,05$  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                    | 1-5               |
| 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             | <b>0,021</b>      |
| 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             | <b>0,046</b>      |
| Содержание, lg КОЕ/г, медиана (интервал изменения) |                     |                    |                    |                    |                       |                   |
| Плесени  | 3,04<br>(2,30-3,78) | 2,3<br>(2,30-3,30) | 2,6<br>(2,30-3,00) | 2,3<br>(2,30-4,18) | 2,3 ↓<br>(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         | 1-5               |
| 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            |

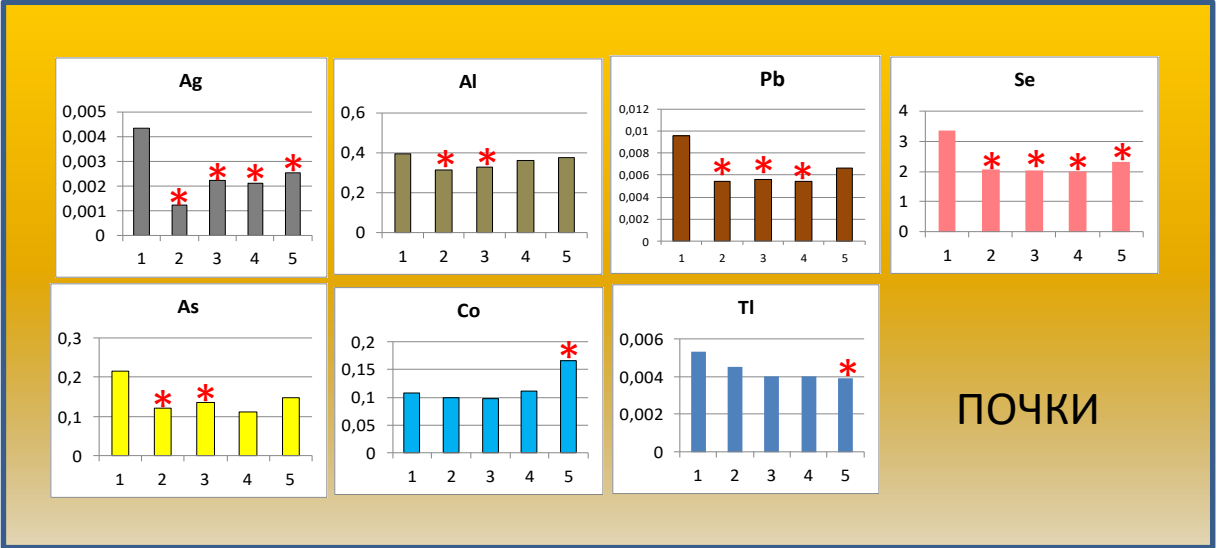
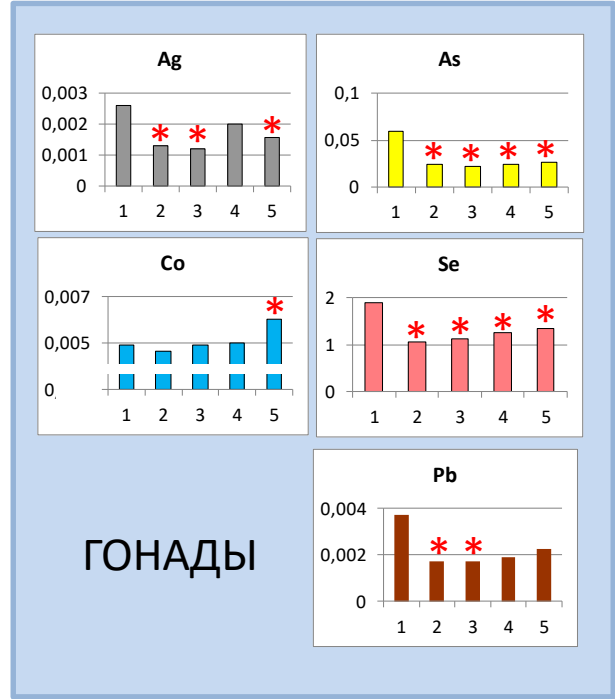
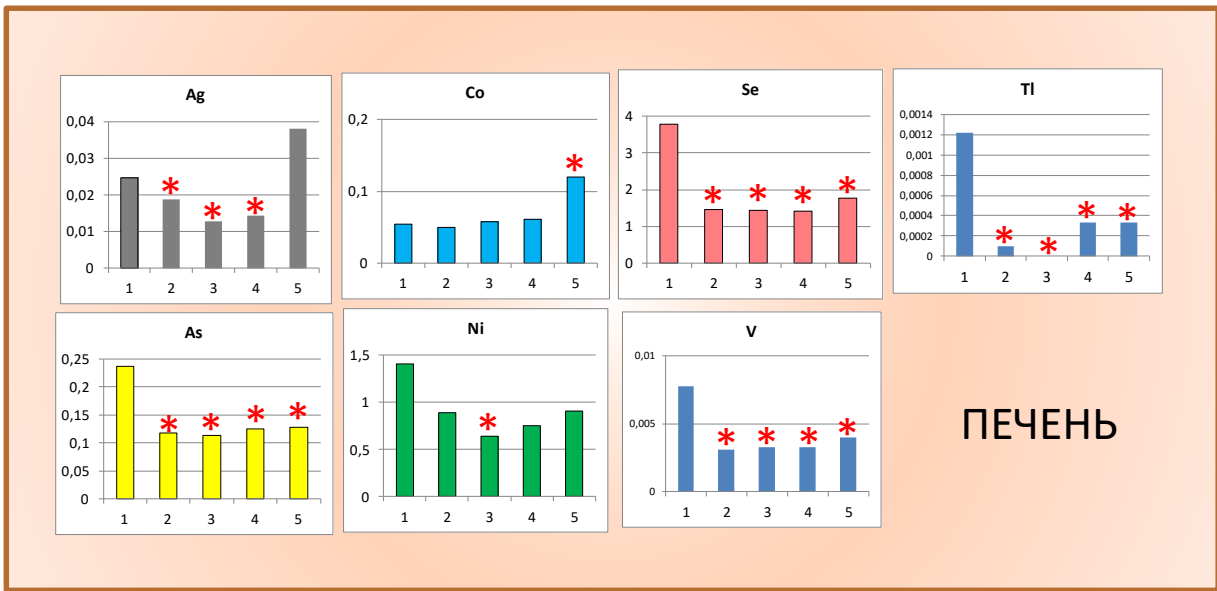
\* P<0,01 при сравнении с группой 1

\*\* 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)

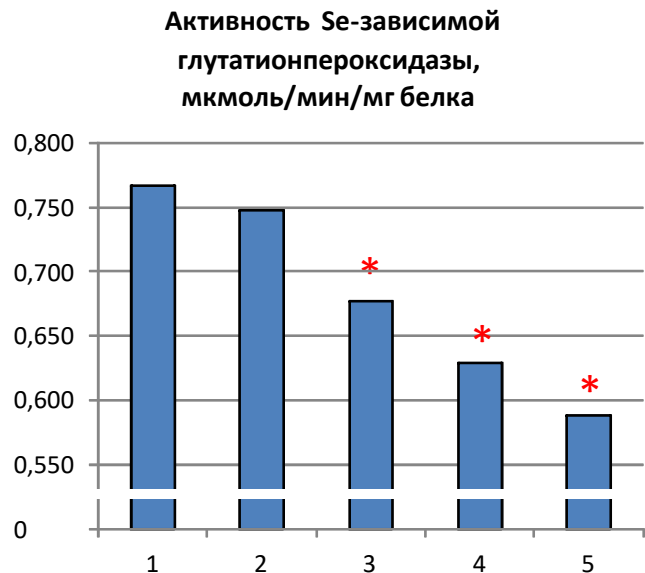
Группы: 1 – контроль  
 2 – 0,01 мг/кг; 3 – 0,1 мг/кг; 4 – 1,0 мг/кг; 5 – 10 мг/кг  
 \* - различие с группой 1 достоверно,  $p < 0,05$



❑ 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

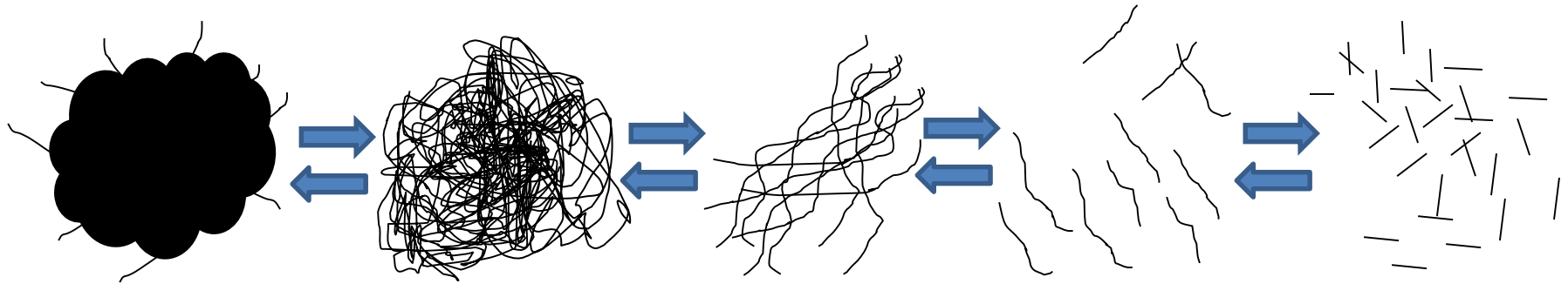
# Влияние ОСУНТ на статус селена (предварительные данные)

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!**