

УДК 57.043, 57.044

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

© А.Ю. Убогов, И.А. Полякова, А.А. Гусев, Е.Б. Горшенева, А.Г. Ткачев

Ключевые слова: биотестирование; подострый эксперимент; многостенные углеродные нанотрубки; нанотоксичность.

Представлен обзор литературных данных по влиянию металлических, оксидных и углеродных наночастиц на различные тест-объекты. Приведены предварительные результаты воздействия углеродного наноструктурного материала «Таунит» на лабораторных мышей. Выявлены воспалительные инфильтрации порталных трактов лимфоидными клетками в печени экспериментальных животных.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биологической безопасности наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки, в настоящее время выдвигается на передний план. Подобные исследования значимы как для потребителей, так и для производителей – заключения о безвредности для окружающей среды и здоровья человека являются необходимым условием продвижения продукции на новые рынки сбыта.

Несмотря на то, что наноматериалы в мире уже используются более 10 лет, ни один вид наноматериалов не был изучен в полном объеме на безопасность ни в одной из стран мира [1].

В последние годы наблюдается рост числа исследований, посвященных токсическим эффектам наночастиц искусственного происхождения. При этом приоритет отдается наиболее массово производимым в настоящее время наноматериалам, таким как металлические и оксидные наночастицы железа, меди, серебра, титана, цинка, а также фуллеренам и углеродным нанотрубкам.

В качестве тест-объектов преимущественно выбираются млекопитающие, как животные, наиболее близкие в физиологическом плане к человеку.

Наночастицы титана. В экспериментах *in vivo*, в которых в качестве тест-объектов использовались крысы обоего пола, наблюдали увеличение массы печени и некроз гепатоцитов при воздействии наночастиц TiO_2 размером 80 нм, а также длительный период их полувыведения, поскольку они практически не выводятся почками.

В опытах *in vivo* однократное пероральное введение наночастиц TiO_2 (размером 25 и 80 нм в дозе 5000 мг/кг) вызывало накопление их в селезенке, почках и легких. Отмечалось также повышенное содержание в сыворотке крови лактатдегидрогеназы и α -гидроксибутиратдегидрогеназы (25 нм). Вызывало увеличение массы печени с некрозом гепатоцитов (80 нм) [2].

Наночастицы железа. Исследования воздействия наночастиц железа на живые организмы, на мышей и крыс, крупный рогатый скот, птиц, рыб, а также неко-

торые растительные объекты описаны в монографии Л.В. Коваленко и Г.Э. Фолманиса [3].

Так, острое пероральное введение мышам суспензии наночастиц железа в дозе 50, 100 и 500 мг/кг не вызывало каких-либо токсических эффектов. Только дробное введение доз 1000, 2000 и 5000 мг/кг приводило к развитию воспалительного процесса на слизистой желудка и кишечника, а также сдвигов в гемопозе. Хроническое воздействие наночастицами железа в дозах 20 и 40 мг/кг в течение 90 дней не приводило к значимым отклонениям от биохимических и гематологических показателей контрольной группы. Кроме того, было показано, что дозы 2–6 мг/кг стимулируют рост животных, бактерицидную активность сыворотки крови и увеличение общего белка в крови.

Низкая токсичность суспензии оксида железа $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в комплексе с гуминовыми кислотами была показана на клеточной культуре фибробластов человека. Слабая токсичность, биосовместимость и магнитные свойства железа позволили создать маркер на основе Fe_2O_3 , стабилизированного декстраном и цитратом натрия для онкодиагностики (торговое название Синерем). Исследование острой токсичности на крысах и собаках показало, что Синерем проявляет остротоксические свойства в дозах, превышающих 400 мг/кг. Изучение хронической токсичности выявило увеличение активности АЛТ и АСТ в крови, ассоциированных с цитоморфологическими изменениями в печени. Синерем не обладал генотоксичностью. Также были обнаружены некоторые тератогенные эффекты и эмбриотоксичность. Ингаляционное воздействие наночастиц оксида железа размерами 22 и 280 нм на крыс в дозах 0,8 и 20 мг/кг вызывало индукцию активных форм кислорода в клетках, гиперемию, гиперплазию и фиброз тканей легких. Также было выявлено нарушение системы свертывания крови [3].

Наночастицы меди. Изучение токсичности наночастиц меди (23,5 нм), микрочастиц меди (17 микрон) и ионов (CuCl_2) на мышах при пероральном введении позволило рассчитать параметры острой токсичности: 413, 5000 и 110 мг/кг. Органами-мишенями токсиче-

ского воздействия оказались печень, селезенка, почки. При этом масса тела животных не изменялась [3, 4].

Наночастицы цинка. Воздействие различных концентраций суспензий микрочастиц, наночастиц и ионов цинка на водные культуры дафний и бактерий выявило летальные концентрации – 8,8, 3,2 и 6,1 мг/л для дафний и 1,8, 1,9 и 1,1 мг/л для бактерий, соответственно.

Различия в токсичности наночастиц и микрочастиц цинка также были показаны на взрослых мышах. Причем микрочастицы цинка оказались токсичнее, чем наночастицы. В обоих случаях наблюдалось поражение почечной функции, также нано-цинк вызывал анемию и нарушение системы свертывания крови [4].

Наночастицы серебра. Ингаляционная токсичность наночастиц серебра размером 19,8–64,9 нм изучалась в течение 28 дней на крысах обоих полов при воздействии в концентрациях: $1,73 \cdot 10^4$, $1,27 \cdot 10^5$ и $1,32 \cdot 10^6$ частиц/см³. Наночастицы серебра обладали способностью осажаться в печени, проникать в результате аксонального транспорта в обонятельную луковицу головного мозга. Установлена высокая стабильность наночастиц серебра в окружающей среде и способность сохранять токсические свойства на протяжении длительного времени [5].

Углеродные нанотрубки и фуллерены. При впрыскивании наночастиц в дыхательные пути мышшей углеродные нанотрубки причиняли значительный вред легким и вызывали гибель нескольких мышшей, но при этом фуллерены не наносили никакого вреда [6].

Было обнаружено, что при интратрахеальном введении образца углеродных нанотрубок, содержащих никель (25,99 %) и йод (5,01 %) в дозе 1 мг/кг, никаких клинических изменений у животных обнаружено не было. При введении этих же образцов веществ в дозе 5 мг/кг наблюдалась 50 % гибель животных на 7 день и 60 % гибель – на 90 день. Клиника отравления характеризовалась вялостью, потерей массы тела. У некоторых животных потеря массы тела достигала 27 % с последующим восстановлением через неделю [7, 8].

В легочной ткани у всех животных, подвергшихся экспозиции в дозе 5 мг/кг, при некропсии на 90 день были обнаружены широко распространенные равномерные вкрапления частиц черного цвета. Наблюдалось генерализованное поражение легких, в ряде случаев с некрозом, явлениями интерстициального и перибронхиального воспаления с вовлечением в воспалительный процесс альвеол. В легочной ткани животных, погибших на 7 и 90 день, отмечалась агрегация частиц черного цвета на макрофагах в альвеолярном пространстве, были также обнаружены формирующиеся гранулемы. Большинство микроскопических гранул локализовалось под эпителием бронхов, а некоторые – на бронхах в виде полипов.

Токсичность наночастиц также определяется их формой и размерами [2, 8–10], при этом наночастицы веретенообразной формы вызывают более разрушительные эффекты в организме нежели подобные им частицы сферической формы, при воздействии на организм отчетливо прослеживается связь доза–эффект. Классические органы-мишени для наночастиц в зависимости от пути поступления – легкие, печень, почки, головной мозг, желудочно-кишечный тракт [11–13]. Токсичность наноматериалов зависит не только от физической природы, способа получения, размеров,

структуры нанокластеров и наночастиц, но и от биологической модели, на которой проводятся испытания. Органы-мишени и механизмы развития токсического эффекта разнообразны. Одни наноматериалы благодаря своей физической природе способны индуцировать активные формы кислорода. Другие способны проникать через тканевые барьеры, внутрь клеток и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами. Третьи, дендримеры различной степени генерации и некоторые другие типы наноматериалов, могут нарушать мембранные структуры, делая их проницаемыми. Рассматривая вышеизложенный материал, можно увидеть, что не всегда и не везде наноматериалы оказывают токсическое или иное повреждающее действие. Так, одни исследователи однозначно обнаружили цитотоксический эффект магнитных частиц на основе оксида железа [14, 15], другие же, напротив, показали, что они безвредны [16].

Это показывает, насколько уникальны по своим свойствам наноматериалы, даже если они состоят из одного и того же химического вещества [17].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что наночастицы, по сравнению с обычными микрочастицами, обладают высокой токсичностью. Они способны проникать в неизменном виде через клеточные барьеры, через гематоэнцефалический барьер проникать в центральную нервную систему, а также циркулировать и накапливаться в органах и тканях, вызывая тем самым более выраженные патоморфологические поражения внутренних органов (например, образование гранулем в легких, цирроз печени, гломерулосклероз). Обладая длительным периодом полувыведения, наноматериалы крайне тяжело выводятся из организма [13, 18].

Следует отметить актуальность исследования токсичности и опасности наночастиц при различных путях поступления в организм, оценки степени потенциального вреда здоровью, т. к. в перспективе ожидается тесный контакт человека и других биологических объектов с наноматериалами. Поэтому целью данного исследования явилась оценка токсичности углеродного наноструктурного материала «Таунит» (УНМ «Таунит», многослойные углеродные нанотрубки), вводимого лабораторным мышам.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – углеродный наноматериал «Таунит» (УНМ «Таунит», многослойные углеродные нанотрубки), производимый в промышленных масштабах ООО «НаноТехЦентр» (г. Тамбов). Данный материал представляет собой одномерные, наномасштабные, нитевидные образования поликристаллического графита, цилиндрической формы с внутренним каналом, в виде сыпучего порошка черного цвета. Гидрофобен, химически инертен, чистота – более 98 %. Гранулы УНМ микрометрических размеров имеют структуру спутанных пучков многослойных трубок (рис. 1), способ получения – газофазное химическое осаждение на металлическом катализаторе (ГФХО) или CVD-процесс. «Таунит» является перспективным материалом для использования его в авиационной, атомной, космической промышленности, в медицине и фармацевтике, для производства суперкомпьютеров, видео-

техники, плоских экранов, мониторов, фильтров широкого назначения. Добавка УНМ «Таунит» улучшает качество смазок, конструкционных композитов, строительных материалов. Гранулы «Таунита» могут служить носителями катализаторов или лекарственных препаратов, также в качестве адсорбентов, источников холодной эмиссии электронов.

Эксперимент проводился согласно методическим рекомендациям [19] с целью определения допустимых условий воздействия, оптимальных суточных доз, для выбора доз в хроническом эксперименте.

Для проведения подострого эксперимента формировались две одновозрастные группы животных (экспериментальная и контрольная группы), состоящие из 10 половозрелых нелинейных самцов лабораторной мыши с исходной массой тела 18–20 г каждая. На протяжении всего эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (ГОСТ Р 50258-92). Карантин составлял 10 дней.

В течение 14 дней экспериментальной группе перорально вводился УНМ «Таунит» путем замены питьевой воды на коллоидный водный раствор. Наноматериал диспергировали в дистиллированной воде при помощи ультразвуковой установки в течение 5 минут, мощность – 300 Вт, частота – 23,740 кГц. Среднесуточная доза исследуемого материала на каждое экспериментальное животное составляла 600 мг/кг.

Контрольную группу составляли мыши, которым вводили дистиллированную воду в аналогичных количествах.

На протяжении всего эксперимента ежедневно оценивалось общее состояние животных. Обращалось вни-

мание на особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности. Наличие и характер судорог, координацию движений и тонус скелетных мышц. Оценивалось состояние кожного и волосяного покрова, окраска слизистых оболочек и размер зрачка. Учитывалось положение хвоста, потребление корма и воды, а также изменение массы тела и другие показатели, которые могут быть использованы для выявления токсического эффекта [20].

По истечении срока экспозиции проводилось вскрытие животных с целью обнаружения возможных очагов кумуляции, а также возможных патологий. Для приготовления гистологических препаратов ткани животных фиксировались в 10 %-ном забуференном формалине, проходили обработку в процессоре Tissue-Tek японской фирмы «Sakura» и заливались в парафин для приготовления блоков. С каждого блока делалось по 3–4 среза толщиной 5–7 мкм. Все препараты окрашивались гематоксилином и эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение эксперимента наблюдалось небольшое нарушение двигательной активности экспериментальных особей, однако нарушения координации и тонуса скелетных мышц выявлено не было. Средние показатели массы тела экспериментальных животных соответствовали животным контрольной группы (табл. 1). Состояние кожного и волосяного покрова, размер зрачка и окраска слизистых оболочек так же соответствовали животным контрольной группы. Средние показатели потребления корма и воды сохранились в пределах нормы.

Таблица 1

Показатели массы тела животных на конец эксперимента

Группа	№ животного	Масса тела на конец эксперимента, г	Среднее значение, г	Ошибка среднего, г
Контроль	1к	26,30	27,24	0,74
	2к	28,30		
	3к	25,50		
	4к	27,80		
	5к	28,20		
	6к	27,10		
	7к	26,90		
	8к	28,10		
	9к	26,70		
	10к	27,50		
Эксперимент	1э	26,30	27,08	0,74
	2э	29,10		
	3э	27,30		
	4э	26,80		
	5э	27,50		
	6э	27,40		
	7э	26,20		
	8э	25,70		
	9э	27,80		
	10э	26,70		

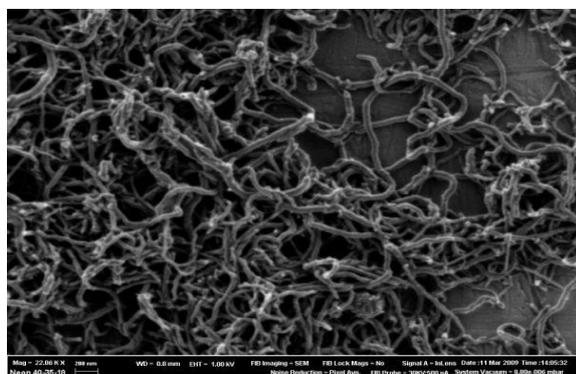
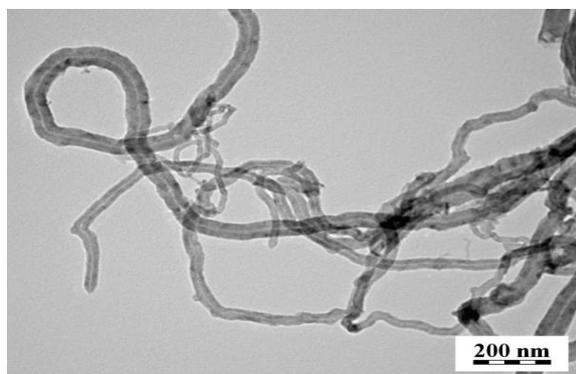


Рис. 1. Электронные микрофотографии углеродного наноструктурного материала «Таунит». Фотографии предоставлены ООО «НаноТехЦентр», г. Тамбов

По завершении эксперимента было произведено гистологическое исследование паренхиматозных органов вскрытых животных. При микроскопическом исследовании внутренних органов, взятых у объектов, занятых в эксперименте, наибольшие изменения были обнаружены в ткани печени. Учитывая большие компенсаторные возможности органа, всякие морфологические признаки воспаления в печеночной паренхиме вызывают определенный интерес. У всех мышей, получавших УНМ «Таунит» с водой, возникала воспалительная инфильтрация печеночной паренхимы, что не наблюдалось у контрольной группы животных. Получение мышами раствора в концентрации 600 мг/кг приводило к воспалительной реакции печеночной паренхимы. Реакция в органе изменялась от очаговой воспалительной инфильтрации портальных трактов лимфоидными клетками (рис. 2) до более выраженной воспалительной инфильтрации, когда разрушалась пограничная пластинка, и воспалительные клетки проникали в печеночную паренхиму. Гепатоциты реагировали развитием дистрофических изменений с появлением зерен и вакуолей в цитоплазме клеток (рис. 2). Количество воспалительных клеток лимфоидного ряда в портальных трактах варьировало от 70 до 130 штук.

Похожая реакция со стороны других органов наблюдалась ранее при введении исследуемого наноматериала самцам лабораторной мыши [21]. Было показано нарушение структуры семенников при введении

наноматериала перорально в дозировке 30 мг/кг в течение месяца.

Имеются литературные данные, подтверждающие, что печень является одним из наиболее частых органов-мишеней для наночастиц [22]. Как известно, печень выполняет в организме множество функций, и одними из важнейших являются гомеостатическая, экскреторная и барьерная. Через вороную вену печени проходит до 70–80 % общего объема циркулирующей крови организма, через собственную печеночную артерию – 20–30 % циркулирующей крови. Вся кровь, поступающая из кишечника в систему кровоснабжения и содержащая продукты расщепления пищевых веществ и продукты гемолиза, сначала проходит через печень, при этом удаляются и обезвреживаются инфекционные агенты и уменьшается концентрация токсинов. Патологические изменения в ткани печени могут возникнуть вследствие хронических инфильтраций паренхимы наноматериалом, приводящей к воспалительной реакции. Возможно, наноматериал вызывает окислительный стресс, который обуславливается активными формами кислорода, генерируемыми наночастицами, способный стимулировать воспалительные, генотоксические и цитотоксические последствия. Впоследствии все воспалительные процессы завершаются организацией. Воспалительный инфильтрат и поврежденные клетки печени замещаются соединительной тканью, что завершается развитием цирроза и может привести к гибели животного.

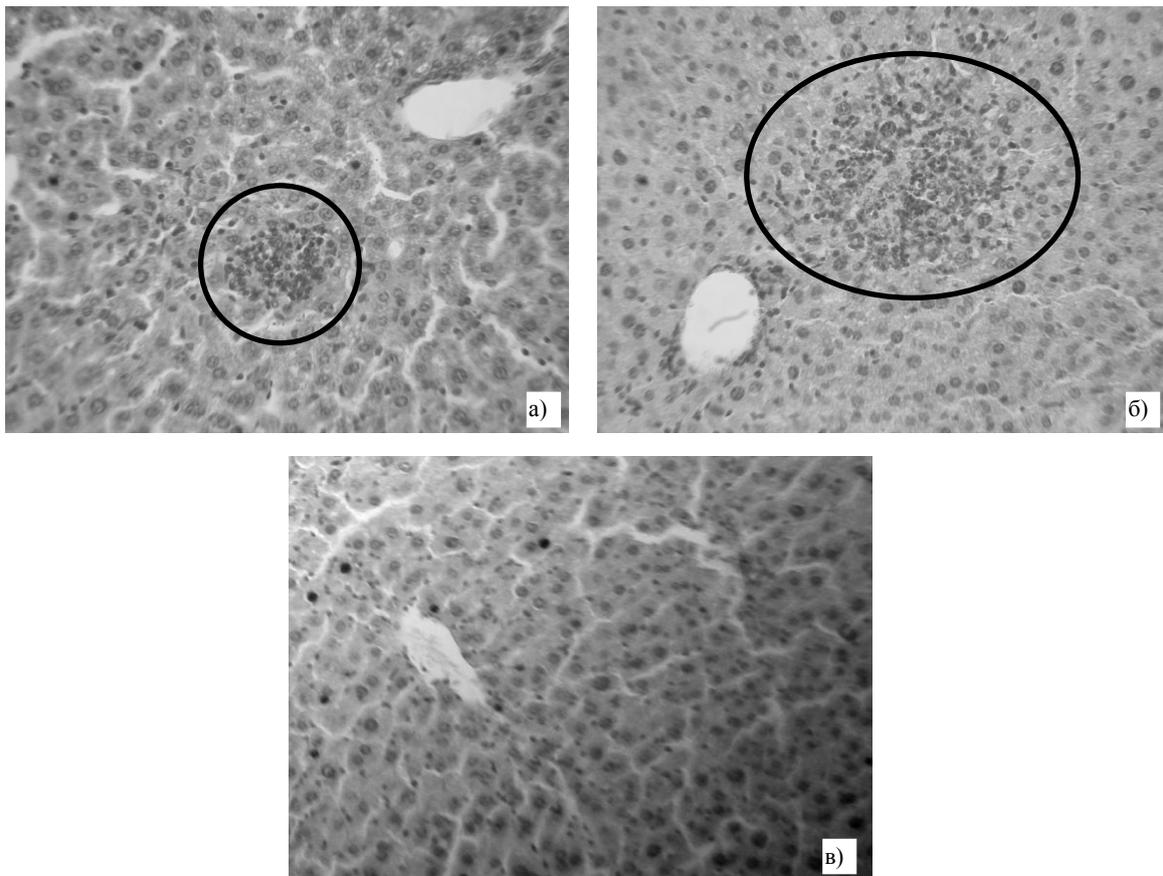


Рис. 2. а) Умеренно выраженная инфильтрация портальных трактов лимфоцитами (не более 70–80 штук). Пограничная пластинка сохранна. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$; б) Инфильтрация портальных трактов лимфоцитами (до 110–130 штук) с разрушением пограничной пластинки. Границы инфильтрата «размыты». Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$; в) печень контрольного животного. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате были сделаны следующие выводы.

1. В течение эксперимента не наблюдалось нарушения координации и тонуса скелетных мышц, состояния кожного и волосяного покрова, размера зрачка и окраски слизистых оболочек.

2. Наблюдалось небольшое нарушение двигательной активности экспериментальных особей.

3. Средняя масса контрольных животных на конец эксперимента составляла 27,24 г, а масса животных экспериментальной группы – 27,08 г.

4. УНМ «Таунит» в концентрации 600 мг/кг оказывает негативное действие на клетки печени экспериментальных животных и стимулирует появление воспалительной инфильтрации печеночной паренхимы. При этом количество лимфоидных клеток в портальном тракте варьировало от 70 до 130 штук.

ЛИТЕРАТУРА

1. О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы: постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 54 от 23.07.2007 г. Доступ из справ.-правовой системы «КонсультантПлюс».
2. Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J.W., Celio M., Catsicas S., Schwaller B., Forro L. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 1121.
3. Коваленко Л.В., Фолманис Г.Э. Биологически активные нанопорошки железа. М.: Наука, 2006. С. 124.
4. Онищенко Г.Г., Бикотыко Б.Г., Покровский В.И., Потанов А.И. Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов. 2007. URL: <http://www.nanonewsnet.ru/blog/nikst/kontseptsiya-toksikologicheskikh-issledovaniy-nanomaterialov>. Загл. с экрана.
5. Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2007. V. 3. P. 20-31.
6. Курпичников М.П., Шайтан К.В. Специалисты биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова предложили простой и удобный тест для предварительной оценки токсичности наноматериалов. 2009. URL: <http://newsru.com>. Загл. с экрана.
7. Chiu-Wing Lam, James J.T., McCluskey R. et al. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation // *Toxicol. Science.* 2004. V. 77. P. 126-134.
8. Warheit D.B., Lawrence B.R., Reed K.L. et al. Comparative pulmonary assessment of single-wall carbon nanotubes in rats // *Toxicol. Science.* 2004. V. 77. P. 117-125.
9. Hoet P.H., Nemmar A., Nemery B. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 19.
10. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. // *Ibid.* 2004. V. 77. P. 126.
11. Allsopp M., Walters A., Santino D. Nanotechnologies and nanomaterials in electrical and electronic goods: A review of uses and health concerns // *Greenpeace research laboratories.* 2007. December. 22 p.
12. Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G., Alexander A. Carbon nanotubes: review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety // *Toxicological Science.* 2006. V. 92. Iss. 1. P. 5-22.
13. Ostigny C., Lapointe G., Trottier M., Menard L., Cloutier Y., Boutin M., Antoun M., Normand Ch. Health effects of nanoparticles. Studies and research projects. IRSST. 2006. P. 52.
14. Withdrawal assessment report for Sinerem. Report EMEA. CHMP London, 2008. 11527.
15. Zhu M.-T., Feng W.Y., Wang B., Wang T.-Ch., Gu Y.-Q., Wang M., Wang Y., Ouyang H., Zhao Y.-L., Chai Z.-F. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats // *Toxicology.* 2008. V. 247. Iss. 2-3. P. 102-111.
16. Prow T., Smith J.N., Grebe R., Salazar J.H., Wang N., Kotov N., Luty J., Leary J. Construction, gene delivery, and expression of DNA tethered nanoparticles // *Molecular Vision.* 2006. V. 12. P. 606-615.
17. Глушкова А.В., Радилов А.С., Рембовский В.Р. Нанотехнологии и нанотоксикология – взгляд на проблему // *Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды: материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздрава России Российской Федерации / под ред. акад. РАМН Ю.А. Рахманина. М., 2007.*
18. Ryman-Rasmussen J.P. et al. // *Nature Nanotech.* 2009. V. 4. P. 747.
19. Использование лабораторных животных в токсикологическом эксперименте: методические рекомендации / под ред. акад. РАМН П.И. Сидорова. Архангельск, 2002. 15 с.
20. Онищенко Г.Г. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: метод. указания. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 43 с.
21. Гусев А.А., Полякова И.А., Горшеница Е.Б., Ткачев А.Г., Емельянов А.В., Шутова С.В., Зайцева О.Н., Федоров А.В., Васильева Т.В. Половые различия физиологического эффекта углеродного наноструктурного материала – перспективного носителя лекарственных препаратов в эксперименте на лабораторных мышах // *Научные ведомости БелГУ.* 2010. № 21 (92). Вып. 13.
22. Patolla A., McGinnis B., Tchounwou P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotubes in Swiss-Webster mice // *J. Appl. Toxicol.* 2011. Jan; 31 (1). P. 75-83. doi: 10.1002/jat.1579. Epub 2010. Aug 24.

Поступила в редакцию 19 сентября 2011 г.

Ubogov A.Yu., Polyakova I.A., Gusev A.A., Gorsheneva E.B., Tkachev A.G. CARBON NANOTUBES AS FACTOR IN DEVELOPMENT OF INFLAMMATION IN LIVER OF MICE

An overview of the literature on the effect of metal, oxide and carbon nanoparticles in different test – object is given. Preliminary results of carbon nanostructured material impact ‘Taunit’ in laboratory mice are viewed. Inflammatory infiltration of portal tracts with lymphoid cells in the liver of experimental animals are revealed.

Key words: biological testing; subacute experiment; multiwall carbon nanotubes; nanotoxicity.