

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 614.7:612.014.46.084

Беляева Н.Н.¹, Вострикова М.В.¹, Алексеева А.В.¹, Дёмина Н.Н.¹, Сычёва Л.П.²

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ *IN VIVO* ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ А и Е НА ПЕЧЕНЬ КРЫС

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119121, Москва;

²ФГБУ Федеральный медицинский биофизический Центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123098, Москва

Введение. Обзор литературы по нанотехнологиям показывает, что опережающее развитие гигиенических исследований в области нанотоксикологии имеет принципиальное значение, так как позволяет создать основу для внедрения безопасных производств уже на этапе проектирования технологических процессов. Проводится оценка воздействия углеродных нанотрубок (УНТ) на организм для их применения во многих различных технических приложениях, в том числе и для возможного их использования в качестве сорбирующего материала в процессе водоподготовки.

Материал и методы. У пятнадцати групп животных изучено двухнедельное внутрижелудочное воздействие одностенных углеродных нанотрубок (оУНТ) в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг и комплекс витаминов А и Е (АЕ) в дозе 25,3 мг/кг (витамина Е – 25,2 мг/кг и витамина А – 0,1 мг/кг) на печень самцов крыс *vistar*, а также у этой же партии животных через три месяца после двухнедельного эксперимента и однократного воздействия оУНТ в дозе 5 мг/кг. Растворяли оУНТ в подсолнечном масле из расчёта 0,5 мл масла на 100 г массы тела.

Результаты. При двухнедельном исследовании оУНТ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг и через три месяца после однократного воздействия в дозе 5 мг/кг не выявлено повреждений ядра гепатоцитов, однако через три месяца после двухнедельного эксперимента при воздействии обеих доз оУНТ отмечено достоверное повышение этого показателя, как и показателей жировой дистрофии, только по отношению к группам двухнедельного воздействия. Так, при двухнедельном воздействии оУНТ, через три месяца после него, а также через три месяца после однократного воздействия в дозе 5 мг/кг развивается жировая дистрофия. Воздействие комплекса витаминов АЕ в двухнедельном эксперименте и через три месяца после него достоверно ухудшает все изученные показатели в печени крыс, а при его комплексном воздействии с оУНТ показатели остаются на том же изменённом уровне.

Обсуждение. Вероятно, УНТ, попадая в пищеварительный тракт, вызывают патологические изменения как в месте прямого контакта – в тонком кишечнике, так и в удалённом органе – печени, что согласуется и с нашими данными, и с другими исследованиями.

Выводы. оУНТ в разные изученные сроки воздействия вызывает в печени развитие жировой дистрофии, а применение комплекса витаминов А и Е не снижает реакции повреждения печени.

Ключевые слова: одностенные углеродные нанотрубки; комплекс витаминов А и Е; печень крыс.

Для цитирования: Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Алексеева А.В., Дёмина Н.Н., Сычёва Л.П. Структурно-функциональная оценка воздействия *in vivo* одностенных углеродных нанотрубок и комплекса витаминов А и Е на печень крыс. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(11): 1108-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1108-13>

Для корреспонденции: Беляева Наталья Николаевна, доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. генетической токсикологии с группой цитогистологии ФГБУ «ЦСП» Минздрава России. E-mail: belnatnik@mail.ru

Belyaeva N.N.¹, Vostrikova M.V.¹, Alekseeva A.V.¹, Demina N.N.¹, Sycheva L.P.²

STRUCTURAL-FUNCTIONAL *IN VIVO* EVALUATION OF EFFECTS OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES AND COMPLEX OF VITAMINS A AND E ON THE LIVER IN RATS.

¹Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation;

²A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Centre, Moscow, 123182, Russian Federation

Introduction. A review of the literature on nanotechnology shows the advanced development of hygienic research in the field of nanotoxicology to be of fundamental importance, as it allows creating a basis for the introduction of safe production at the design stage of technological processes. The effects of carbon nanotubes (CNT) on the body are evaluated for the use in many different technical applications, including the alleged possibility of their use as a sorbing material in the water treatment process.

Material and Methods. Two-weeks intragastric effect of single-walled carbon nanotubes (oUNT) at doses of 0.05 and 0.5 mg/kg and a complex of vitamins A and E (AE) at a dose of 25.3 mg/kg (vitamin E – 25.2 mg/kg and vitamin A – 0.1 mg/kg) on the liver of male Wistar rats, as well as in the same batch of animals three months after a two-week experiment and a single exposure to oUNT at a dose of 5 mg/kg were studied in fifteen groups of animals. oUNT was dissolved in sunflower oil at the rate of 0.5 ml of oil per 100 g of body weight.

Results. Two-weeks study of oUNT at doses of 0.05 and 0.5 mg/kg and three months after a single exposure at a dose of 5 mg/kg revealed no damage to the nucleus of hepatocytes, but three months after a two-week experiment, when

exposed to both doses of oUNT, showed a significant increase in this index, as well as indices of fatty degeneration, only in relation to groups of the two-week exposure. Thus, with two-weeks exposure of oUNT, three months after it, as well as three months after a single exposure at a dose of 5 mg/kg the fatty degeneration develops. The effect of the complex of vitamins AE in the two-weeks experiment and three months after it significantly worsens all the studied parameters in the rat liver, and with its complex effect with oUNT indices remain at the same changed level.

Discussion. Probably UNT, getting into the digestive tract, cause pathological changes both in the place of direct contact – in the small intestine and in the remote body – the liver, which is consistent with both our data and previous studies.

Conclusion. oUNT in different studied periods of exposure causes the development of fatty degeneration in the liver; and the use of vitamins A and E does not reduce the response of the liver damage.

Key words: single-walled carbon nanotubes; complex of vitamins A and E; liver of rats; response of the liver damage.

For citation: Belyaeva N.N., Vostrikova M.V., Alekseeva A.V., Demina N.N., Sycheva L.P. Structural-functional in vivo evaluation of effects of single-walled carbon nanotubes and complex of vitamins A and E on the liver in rats. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(11): 1108-13. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1108-13>

For correspondence: Natalia N. Belyaeva, MD, Ph.D., DSci., Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Genetic toxicology with the group of cytohistology of the Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: belnatnik@mail.ru

Information about authors: Belyaeva N.N., <http://orcid.org/0000-0003-2504-9815>; Alekseeva A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2204-8382>; Sycheva L.P., <http://orcid.org/0000-0002-7370-0169>.

Долевое участие авторов: Belyaeva N.N. – 60%; Vostrikova M.V. – 20%; Alekseeva A.V. – 3%; Demina N.N. – 3%; Sycheva L.P. – 4%.

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

Acknowledgment. The authors are grateful to the staff of the laboratory: the head of the laboratory, Dr. Biol. sciences, prof. Mikhailova R.I. for the formulation of the experiment, Ph.D. Mamonov R.A. for conducting animal euthanasia and their withdrawal from the experiment, laboratory assistants-researchers Bahareva T.D. and Suravtsova V.A. for the preparation of histological material for viewing. The work was performed in the framework of the State Mission of the Ministry of Health of Russia (state registration number 115072870026).

Received: 12 March 2018

Accepted: 18 October 2018

Введение

В настоящее время токсикологическая оценка наночастиц и наноматериалов чрезвычайно важна [1], однако ведется крайне недостаточно, что не позволяет в должной мере оценить риски их воздействия на здоровье человека [2]. Вместе с тем, опережающее развитие гигиенических исследований в области нанотехнологий имеет принципиальное значение, так как позволяет создать основу для внедрения безопасных производств уже на этапе проектирования технологических процессов [3, 4]. Было показано, что для раскрытия влияния наночастиц на организм при структурно-функциональном определении их токсичности необходима экспериментальная оценка *in vivo* воздействия различных доз на теплокровных лабораторных животных [5]. Одним из наиболее востребованных видов современных наноматериалов являются наноструктурированные формы углерода, а именно углеродные нанотрубки (УНТ). Выделяют одностенные (оУНТ), олигостенные (2–3 слоя) и многостенные (МУНТ), где МУНТ представляют собой один из самых популярных (сравнимых только с наночастицами серебра и диоксида титана) объектов нанотоксикологических исследований [6]. Необходимо оценивать воздействие УНТ на организм [7] для применения во многих различных технических приложениях, в том числе и для предполагаемой возможности их использования в качестве сорбирующего материала в процессе водоподготовки.

Анализу большого числа ранних работ по влиянию УНТ на разные биологические объекты посвящен ряд статей, тогда как работы применительно к воздействию УНТ на теплокровные организмы освещаются в литературе в значительно меньшей степени [3, 4, 8]. Однако в последнее время число работ, посвященных влиянию УНТ на организм не только теплокровных животных [9–15, 18], но и человека [17, 19], возрастает.

Волокнистая структура нанотрубок и длительная персистенция в тканях придают им сходство с асбестом. Было показано, что УНТ добираются до лёгких, скапливаются в них, а дальше происходит то, что очень напоминает попадание в лёгкие частиц асбеста, которое может привести к раку [3, 4, 17]. Однако ряд исследователей обнаружили, что МУНТ оказывали токсические эффекты (и даже более выраженные, чем асбест) за счёт повреждения мембраны и активации макрофагов, при этом были отвергнуты такие механизмы цитотоксичности, как оксидативный стресс, экспрессия генов, апоптоз. Кроме того, они считают, что МУНТ способны оказывать токсические эффекты даже не про-

никая в клетку, в отличие от волокон асбеста [17, 19, 20] При трансмиссионной электронной микроскопии также не обнаружилось оУНТ внутри альвеолярных клеток человека A549 [21].

Нами ранее было исследовано влияния МУНТ [6, 7] и коротких (кУНТ) [18] на печень мышей, при этом было крайне интересно изучить у крыс эффект воздействия оУНТ на печень как центральный орган детоксикации. Кроме того, необходимо было изучить влияние антиоксидантов, в частности, одного из них – витамина E, на процессы повреждения печени.

Материал и методы

Одностенная углеродная нанотрубка имеет промышленное название Tuball и производится ООО «Плазмохимические технологии» в Новосибирске. Этот материал представляет собой оУН со средним внешним диаметром 1–2 нм. По химическому составу образец на 85% состоит из углерода, а неорганических примесей (железо) менее 15%. Технология позволяет получить неагломерированные углеродные наноматериалы с заданной структурой. Эта оУНТ Tuball имеет паспорт безопасности химической продукции РПБ № 91735575 21 38016 от 12 мая 2015 г., по которому она относится к умеренно опасным продуктам – 3-му классу опасности по степени воздействия на организм в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76, может вызывать обратимое механическое раздражение глаз, обладает фиброгенным действием. Мутагенное действие не установлено. При попадании в окружающую среду может механически загрязнять водоёмы и почву.

Эксперимент проведён на белых крысах (самцах) линии Вистар (Филиал «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН), которые содержались в камерах на стандартной диете при свободном доступе к воде и пище. В связи с плохой растворимостью УНТ в воде [22] в данном эксперименте для возможности его внутрижелудочного введения оУНТ растворяли в подсолнечном масле из расчёта 0,5 мл масла на 100 г массы тела животных. Кроме того, исследовалось воздействие комплекса витаминов A и E (AE), где витамин E, как считают, обладает антиоксидантным и иммуностимулирующим действием. AE содержит витамина A 100 000 МЕ и витамина E – 100 мг, при введении на одно животное его доза составляла 25,3 мг/кг (из расчёта рекомендованной суточной дозы витаминов в пересчёте на крыс: 25,2 мг/кг витамина E и 0,2 мг/кг витамина A). В случае комплексного воздействия с оУН добавляли 25,3 мг/кг AE. Исследовалось по 6 животных из каждой группы.

Структурно-функциональные показатели в печени крыс контрольных групп к двухнедельному воздействию оУН и через три месяца после него

Показатель	Значения показателей в контрольных группах ($M \pm S$; доверительные границы средней)					
	Общий контроль, (К)	Через 2 недели		Через 3 месяца		
		Группа 1 с подсолнечным маслом	Группа 2, интактный контроль	Общий контроль, (К ²)	1 ² группа	2 ² группа
ИАЯГ, %	23,7 ± 0,5 17,0 ÷ 30,8	22,3 ± 3,6 14,2 ÷ 30,4	25,1 ± 11,3 14,0 ÷ 35,9	56,6 ± 2,4* 52,2 ÷ 61,0 <i>от 1, 2 и К гр.</i>	48,0 ± 2,5* 43,3 ÷ 52,0 <i>от 1, 2 и К гр.</i>	44,3 ± 3,2* 34,9 ÷ 53,7 <i>от 1 и К гр.</i>
ИАЦГ, %	16,2 ± 0,5 7,5 ÷ 26,5	6,0 ± 4,1 0 ÷ 13,7	26,4 ± 14,2 8,2 ÷ 44,6	81,5 ± 8,6* 62,5 ÷ 100,0 <i>от 1, 2 и К гр.</i>	68,8 ± 15,9* 30,2 ÷ 100,0 <i>от 1, К гр.</i>	94,2 ± 2,7* 87,8 ÷ 100,0 <i>от 1, 2 и К гр.</i>
Жировая дистрофия, балл	0,9 ± 0,03 0,3 ÷ 1,5	0,3 ± 0,2 0,1 ÷ 0,5	1,4 ± 0,5 0,3 ÷ 2,6	1,3 ± 0,2* 0,7 ÷ 1,7 <i>от 1 гр.</i>	0,8 ± 0,09* 0,6 ÷ 1,0 <i>от 1 гр.</i>	1,7 ± 0,4* 0,8 ÷ 2,6 <i>от 1 гр.</i>

Примечание. * – достоверные отличия показателей. Здесь и в табл. 2, 3: курсивом отмечены достоверности от различных групп.

У 15 групп животных изучено двухнедельное внутрижелудочное воздействие оУНТ и АЕ на печень крыс, а также у этой же партии животных через три месяца после двухнедельного эксперимента. При этом в отличие от двухнедельного воздействия, через три месяца группы получили дополнительный шифр – «2». Исследовано:

а) воздействие оУНТ в дозах: 0,05 мг/кг (3 и 3² группы); и 0,5 мг/кг (4 и 4² группы);

б) воздействие АЕ в дозе 25,3 мг/кг (5 и 5² группы);

в) комплексное воздействие оУНТ, 0,05 мг/кг и АЕ (6 и 6² группы); оУНТ 0,5 мг/кг и АЕ (7 и 7² группы);

г) 2 группы крыс были контрольными: интактный контроль (2 и 2² группы); и группы животных, получавших подсолнечное масло (1 и 1² группы);

д) через три месяца исследовалась группа крыс, получившая однократно оУНТ в дозе 5 мг/кг (группа 8).

Условия проведения и вывода животных из эксперимента проводили с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г., № 755). Животные выводились из эксперимента путём эвтаназии с помощью углекислого газа с последующей декапитацией.

Кусочки печени проводили и заливали по стандартной методике, срезы просматривали и фотографировали на цифровом биологическом микроскопе Leica DM 2500 с программным обеспечением перевода изображения на экран компьютера. В печени отмечали морфологические изменения и морфометрически подсчитывали индекс альтерации ядер гепатоцитов в % (ИАЯГ),

отмечая клетки с лизисом и рексисом ядер, индекс альтерации цитоплазмы гепатоцитов в % (ИАЦГ), отмечая клетки с жировой дистрофией, и степень выраженности жировой дистрофии в баллах: когда часть гепатоцитов с мелкокапельной жировой дистрофией (0,5 баллов), когда все гепатоциты с мелкокапельной жировой дистрофией (1 балл), когда гепатоциты как с мелкокапельной, так и с крупнокапельной жировой дистрофией (2 балла), и когда все гепатоциты были с крупнокапельной жировой дистрофией (3 балла). Статистически определяли среднюю величину показателей (M), и доверительные границы средней с уровнем достоверности, равным 95%. Достоверными различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

Достоверных отличий морфофункциональных показателей в печени между двумя контрольными группами не было выявлено, что позволило объединить их в одну группу (табл. 1, рис. 1 и 2, см. на вклейке). Через три месяца не было достоверных отличий между группами 1² и 2², что позволило их также объединить в одну группу К² (см. табл. 1). Показано, что все изученные показатели через три месяца достоверно ухудшались по сравнению с двухнедельным экспериментом.

Двухнедельное воздействие оУНТ как в дозе 0,05 мг/кг (3г), так и в дозе 0,5 мг/кг (4 г) не вызывало достоверных изменений ИАЯГ (табл. 2). Однако в этих группах усиливалась жировая дистрофия, определяемая по показателям ИАЦГ и степени её выраженности (табл. 2, рис. 3, см. на вклейке). Так, ИАЦГ у крыс группы 3 достоверно повышался по отношению к таковым показателям у крыс группы 1, а при увеличении дозы оУНТ до

Показатели в печени крыс при двухнедельном воздействии оУНТ, через три месяца после него и через три месяца после однократного воздействия оУНТ

Показатель	Значения показателей при воздействии ($M \pm S$; доверительные границы средней)				
	Через 2 недели		Через 3 месяца		
	оУНТ-0,05 мг/кг группа 3	оУНТ-0,5 мг/кг группа 4	оУНТ-0,05 мг/кг 3 ² группа	оУНТ-0,5 мг/кг 4 ² группа	Однократно оУНТ 5 мг/кг группа 8
ИАЯГ, %	29,1 ± 0,4 18,3 ÷ 39,9	33,4 ± 5,1 23,8 ÷ 43,0	49,8 ± 4,2* 39,5 ÷ 60,1 <i>от 1, 2, К гр.</i>	46,5 ± 3,5* 39,2 ÷ 53,8 <i>от 1, 2, К гр.</i>	41,6 ± 4,4 (27,6 ÷ 55,6)
ИАЦГ, %	49,5 ± 20,1* 26,3 ÷ 72,7 <i>от 1 гр.</i>	89,0 ± 13,7* 54,2 ÷ 100,0 <i>от 1, 2, К гр.</i>	97,2 ± 0,9** 95,1 ÷ 99,3 <i>от 1, 2, К, 3 гр.</i>	98,0 ± 0,5** 96,3 ÷ 99,7 <i>от 1, 2, К, 3 гр.</i>	90 ± 3,0* 79,2 ÷ 100,0 <i>от 1, 2, К, 3 гр.</i>
Жировая дистрофия, балл	1,3 ± 0,6* 0,7 ÷ 1,9 <i>от 1 гр.</i>	1,8 ± 0,9* 1,0 ÷ 2,6 <i>от 1 гр.</i>	2,7 ± 0,2** 2,3 ÷ 3,1 <i>от 1, К, 3 гр.</i>	2,2 ± 0,2* 1,8 ÷ 2,6 <i>от 1, К гр.</i>	1,4 ± 0,4* 0,9 ÷ 1,9 <i>от 1 гр.</i>

Примечание. Здесь и в табл. 3: достоверные отличия показателей: * – по отношению к двухнедельному контролю; ** – по отношению к аналогичной группе при двухнедельном воздействии.

Показатели в печени крыс при двухнедельном воздействии АЕ, в комплексе с оУНТ и через 3 месяца после этих воздействий

Показатель	Значения показателей при комплексном воздействии оУНТ и АЕ ($M \pm S$; доверительные границы средней)					
	Через 2 недели			Через 3 месяца		
	АЕ, 25,3 мг/кг группа 5	оУНТ, 0,05 мг/кг + АЕ группа 6	оУНТ, 0,5 мг/кг + АЕ группа 7	АЕ, 25,3 мг/кг 5 ² группа	оУНТ, 0,05 мг/кг + АЕ 6 ² группа	оУНТ, 0,5 мг/кг + АЕ 7 ² группа
ИАЯГ, %	44,1 ± 5,5* 31,9 ÷ 56,3 <i>от 1 и К гр.</i>	39,8 ± 6,7* 30,2 ÷ 49,0 <i>от 1 и К гр.</i>	46,1 ± 4,4 36,3 ÷ 55,9* <i>от 1, 2, К гр.</i>	52,6 ± 5,2* 39,3 ÷ 65,9 <i>от 1, 2, К гр.</i>	29,0 ± 2,6 13,0 ÷ 42,0	31,5 ± 2,9 14,3 ÷ 48,7
ИАЦГ, %	95,0 ± 2,7** 88,6 ÷ 100,0 <i>от 1, 2, К и 3 гр.</i>	89,7 ± 5,5* 77,3 ÷ 100,0 <i>от 1, 2, К гр.</i>	71,8 ± 16,1 32,8 ÷ 100,0* <i>от 1 и К гр.</i>	99,3 ± 0,7** 97,6 ÷ 100,0 <i>от 1, 2, К и 3 гр.</i>	93,2 ± 1,9** 92,7 ÷ 93,7 <i>от 1, 2, К, 3 гр.</i>	82,2 ± 7,1* 60,7 ÷ 100,0 <i>от 1, 2 и К гр.</i>
Жировая дистрофия, балл	2,2 ± 0,4* 1,3 ÷ 3,1 <i>от 1 гр.</i>	1,9 ± 0,4* 0,7 ÷ 2,9 <i>от 1 гр.</i>	2,3 ± 0,4 1,2 ÷ 3,4* <i>от 1 гр.</i>	2,6 ± 0,2* 2,2 ÷ 3,0 <i>от 1, К гр.</i>	1,8 ± 0,2* 1,4 ÷ 2,2 <i>от 1 гр.</i>	1,4 ± 0,3* 0,8 ÷ 2,0 <i>от 1 гр.</i>

0,5 мг/кг (4 группа) показатель ИАЦГ ещё увеличивался по отношению ко всем контрольным группам. Степень выраженности жировой дистрофии как у крыс в группе 3, так и в группе 4 достоверно повышалась по отношению к аналогичному показателю в группе 1.

Через три месяца после двухнедельного воздействия оУНТ в дозах 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг (см. табл. 2, группы 3² и 4²) для показателей ИАЯГ отмечалась только повышение по сравнению с двухнедельным экспериментом, тогда как достоверное увеличение наблюдалось для жировой дистрофии (по ИАЦГ и степени её выраженности) по отношению не только ко всем контрольным группам двухнедельного воздействия, но и к группе 3, исследованной в двухнедельном эксперименте.

Также через три месяца после однократного воздействия оУНТ в дозе 5 мг/кг (группа 8) происходило достоверное по отношению к группе 3 повышение показателя ИАЦГ.

Двухнедельное воздействие АЕ (табл. 3, группа 5; рис. 4, см. на вклейке) вызвало в печени достоверное по отношению к контрольным животным этого срока эксперимента усиление всех изученных показателей повреждения.

Обсуждение

Оценивая все полученные результаты по оценке влияния УНТ на структурно-функциональные показатели печени на организм теплокровных животных как в данном эксперименте, так и в других исследованиях по воздействию УНТ [3, 4, 13, 18], мы отмечаем схожесть воздействия на печень мышей и крыс разных типов УНТ и оУНТ, и кУНТ, и МУНТ в различных режимах и дозах, что нашло подтверждение в ряде работ [23, 24].

Для печени в зависимости от времени воздействия эффект развивается по нарастающей выраженности реакций повреждения, затрагивая вначале при более коротких временных интервалах ядра отдельных гепатоцитов в виде их лизиса и рексиса, а затем при более длительном воздействии и в более высоких дозах вплоть до образования микронекрозов. В печени развивается также жировая дистрофия, увеличивающаяся по мере повышения дозы и времени воздействия. Одним из вариантов механизма воздействия УНТ на печень предлагается считать прямую или непрямую активацию купферовских клеток, что является причиной развития дистрофических изменений в клетках печени [23]. Некоторые авторы [25] связывают повреждения в результате воздействия УНТ с окислительным стрессом и обнаружили в печени его достоверное повышение, тогда как другие исследователи [26], напротив, не выявили повышения уровня продуктов окислительного повреждения в моче крыс, получавших МУНТ и ОУНТ перорально в дозах до 50 мг/кг. Возможность проникновения оУНТ через барьер стенки кишечника была смоделирована на монослое кишечных эпителиальных клеток теплокровных животных [26]. Вместе с тем, при изучении воздействия УНТ на кишечник нами [10, 13] была высказана гипотеза, что УНТ повреждают ворсины, вызывая у них апикальные некрозы, что нашло подтверждение в работе [23], объясняя схожесть

УНТ с волокнами асбеста. Вероятно, что УНТ, попадая в пищеварительный тракт, вызывают патологические изменения как в месте прямого контакта – в тонком кишечнике, так и в удалённом органе – печени, что согласуется с нашими данными и с другими работами [23, 24, 28–30]. Кроме того, отмечается [31] и развитие воспалительных процессов в печени мышей при действии УН.

Воздействие АЕ в двухнедельном эксперименте достоверно ухудшает все изученные показатели в печени крыс, а при его комплексном воздействии с оУНТ показатели остаются на том же изменённом уровне по отношению к животным контрольных групп. Через три месяца показатель ИАЦГ оказывается также достоверно хуже, чем при воздействии одного оУНТ при двухнедельной экспозиции, что свидетельствует о том, что АЕ повреждает печень крыс, а при его комплексном воздействии с оУН не снижает реакции повреждения печени. Если, как мы уже обсудили выше, воздействие оУН не связано с окислительным стрессом, то тогда становится понятно, почему АЕ не снижает повреждения печени.

Нами окончательно не выяснен механизм воздействия оУНТ на печень, так как для раскрытия природы воздействия наночастиц на этот орган при структурно-функциональном анализе токсичности наночастиц необходим их дальнейшая экспериментальная оценка *in vivo* на теплокровных лабораторных животных.

Выводы

1. У контрольных животных через три месяца эксперимента увеличились все изученные показатели повреждения печени.
2. оУНТ при двухнедельном исследовании в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг и через три месяца после однократного воздействия в дозе 5 мг/кг не повреждают ядра гепатоцитов, определяемые по показателю ИАЯГ, однако через три месяца после двухнедельного эксперимента при воздействии обеих доз оУНТ отмечено достоверное повышение этого показателя по отношению к контрольным группам только двухнедельного эксперимента.
3. Как двухнедельное воздействие оУНТ, так и через три месяца после него, а также через три месяца после однократного его воздействия в дозе 5 мг/кг развивается жировая дистрофия цитоплазмы, определяемая по увеличению ИАЦГ и степени выраженности жировой дистрофии. Кроме того, в этот срок эксперимента достоверно увеличивается показатель ИАЦГ по отношению к двухнедельному воздействию оУНТ в дозе 0,05 мг/кг.
4. Воздействие АЕ в двухнедельном эксперименте достоверно ухудшает все изученные показатели в печени крыс, а при его комплексном воздействии с оУНТ показатели остаются на том же изменённом уровне по отношению к животным контрольных групп. Через три месяца показатель ИАЦГ оказывается также достоверно хуже, чем при воздействии одного оУНТ при двухнедельной экспозиции, что свидетельствует о том, что АЕ повреждает печень крыс, а при его комплексном воздействии с оУН не снижает реакции повреждения печени.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории (зав. лаб. д. б.н., профессор Михайловой Р.И.) за постановку эксперимента, к.м.н. Мамонову Р.А. за проведение животного эксперимента и вывод их из эксперимента, лаборантам-исследователям Бахарева Т.Д. и Суравцовой В.А. за подготовку гистологического материала к просмотру.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания МЗ России (№ гос. регистрации 115072870026).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Долевое участие авторов: Беляева Наталья Николаевна – 60%; Восстрикова Марина Владимировна – 20%; Алексеева Анна Венедиктовна – 3%; Демина Надежда Николаевна – 3%; Сычева Людмила Петровна – 4%.

Л и т е р а т у р а

(пп. 6–7, 14–17, 19–22; 24–28 см. References)

1. Онищенко Г. Г. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О надзоре за производством и оборотом продукции, содержащей наноматериалы». Информационное письмо Роспотребнадзора. 2007; № 0100.4502–07–02 от 02.05. 2007.
2. Филатов Б.Н. Медико-гигиенические проблемы нанотоксикологии. *Материалы научной конференции «Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы»*. Волгоград. 2014; 7-10.
3. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90 (4): 578-84.
4. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Шведова А.А., Оценка риска здоровью при воздействии углеродных нанотрубок от токсикологии к эпидемиологическим исследованиям (обзор современного состояния проблемы). *Российские нанотехнологии*. 2015; 10 (5-6): 144-50.
5. Беляева Н.Н. Структурно-функциональная клеточная оценка воздействия наночастиц и нанопродукции на организм теплокровных животных. Сборник научных трудов: «Биомедицины XXI века: достижения и перспективные направления развития» (под ред. академика Ю.А. Рахманина). Из-во: Российской академии естественных наук. 2016: 45-52.
6. Саяпинана Н.В., Сергиевич А.А., Баталова Т.А., Новиков М.А., Асадчева А.Н., Чайка В.В. и др. Биологическая и токсикологическая опасность углеродных нанотрубок: обзор российских публикаций. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014; 16 (5): 949-53.
7. Рыбалкин С.П., Михина Л.В., Онацкий Н.М. Изучение токсичности наноструктурированного углерода в форме одностенных углеродных нанотрубок и укороченных одностенных углеродных нанотрубок при ингаляционном пути поступления крысам. *Прикладная токсикология*. 2013; 4: 32-9.
8. Беляева Н.Н., Михайлова Р.И., Сычева Л.П., Савостикова О. Н., Зеленкина Е.А., Гасимова З.М. и др. Оценка влияния многослойных углеродных нанотрубок на морфофункциональное клеточное состояние тонкого кишечника мышей. *Гигиена и санитария*. 2012; 6: 58-61.
9. Сычева Л.П., Михайлова Р.И., Беляева Н.Н., Журков В.С., Юрченко В.В., Савостикова О.Н. и др. Изучение мутагенного и цитотоксического действия многослойных углеродных нанотрубок и активного угля в шести органах мышей *in vivo*. *Российские нанотехнологии*. 2015; 10 (3-4): 110-5.
10. Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Савостикова О.Н. Структурно-функциональный анализ 6-месячного воздействия многослойных углеродных нанотрубок на тонкую кишку крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161 (6): 785-8.
11. Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Юрченко В.В., Михайлова Р.И., Каменецкая Д.Б., Рыжова И.А. Оценка воздействия нанотрубок на организм теплокровных лабораторных животных. *Научный вестник ЯНАО*. 2017; 96 (3): 79-81.
12. Беляева Н.Н. Морфофункциональное исследование воздействия коротких углеродных нанотрубок на печень Сборник материалов VIII Международного симпозиума «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения» (под ред. Ю.А. Рахманина, Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012 г.: 13-9.

23. Масютин А.Г., Ерохина М.В., Сычевская К.А., Гусев А.А., Васюкова И.А., Ткачев А.Г. и др. Многостенные углеродные нанотрубки индуцируют патологические изменения в органах пищеварительной системы мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161 (1): 143–8.
29. Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б. Углеродные нанотрубки: механизмы действия, биологические маркеры и оценка токсичности *in vivo*. *Гигиена и санитария*. 2017; 2.: 176–86.
30. Горшенева Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2014; 6 (1): 48–55.
31. Убогов А.Ю., Полякова И.А., Гусев А.А., Горшенева Е.Б., Ткачев А.Г. Углеродные нанотрубки как фактор развития воспалительного процесса в печени мышей. *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки*. 2011; 16 (5): 1338-42.

References

1. Onichenko G. G. Resolution of Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation « About the oversight of the production and circulation of goods containing nanomaterials “. //Information letter from Rospotrebnadzor (The Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being). № 0100/4502–07–02 от 02.05.2007. (in Russian)
2. Filatov B.N. Medical-hygienic problems of nanotoxicology. *Proceedings of scientific conference “Nanotoxicology: achievements, problems and prospects”*. Volgograd, 2014; 7-10. (in Russian)
3. Fathutdinova L.M., Haliullin T.O., Zalyalova P. P. Toxicity of artificial nanoparticles. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2009; 90 (4): 578-84. (in Russian)
4. Fathutdinova L.M., Haliullin T.O., Shvedova A.A., Health risk assessment under the influence of carbon nanotubes: from toxicology to epidemiological studies (review of the current state of the problem). *Rossijskie nanotekhnologii*. 2015; 1 (5-6): 144-50. (in Russian)
5. Belyaeva N.N. Structural-functional cellular assessment of the effect of nanoparticles and nanoproducts on the organism of warm-blooded animals. *Sbornik nauchnyh trudov: «Biomediciny XXI veka: dostizheniya i perspektivnye napravleniya razvitiya»* (pod red. akademika Yu.A.Rahmanina). Iz-vo: Rossijskoj akademii estestvennyh nauk. 2016; 45-52. (in Russian)
6. Tetley T.D. New perspectives in nanomedicine. *National Heart and Lung Institute, United Kingdom*; 2013; 140 (2): 176-85.
7. Andrew M. Smith, Michael C. Carbon nanoparticles charge up old cancer treatment to powerful effect. *Nature Nanotechnology*. University of Edinburgh. 2008; 3: 697.
8. Sayapinana N.V., Sergievich A.A., Batalova T.A., Novikov M.A., Asadcheva A.N., Chajka V.V. i dr.: Biological and toxicological hazards of carbon nanotubes: a review of Russian publications. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2014; 16 (5): 949-53. (in Russian)
9. Rybalkin S.P., Mihina L.V., Onackij N.M. The study of toxicity of nanostructured carbon in the form of single-wall carbon nanotubes and shortened single-wall carbon nanotubes during inhalation pathways to rats. *Prikladnaya toksikologiya*. 2013; 4 (1): 32-9. (in Russian)
10. Belyaeva N.N., Mihajlova R.I., Sycheva L.P., Savostikova O.N., Zelenkina E.A., Gasimova Z.M., et al. Evaluation of the effect of multi-walled carbon nanotubes on morphofunctional status of the small intestine of mice. *Gigiena i sanitariya*. 2012; (6): 58-61. (in Russian)
11. Sycheva L.P., Mihajlova R.I., Belyaeva N.N., Zhurkov V.S., Yurchenko V.V., Savostikova O.N. et al. The study of mutagenic and cytotoxic effect of multi-walled carbon nanotubes and activated carbon in six organs of mice, *in vivo*. *Rossijskie nanotekhnologii*. 2015. 10 (3-4): 110-5. (in Russian)
12. Belyaeva N.N., Sycheva L.P., Savostikova O.N. Structural-functional analysis of 6-month exposure of multi-walled carbon nanotubes on the small intestine of rats. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*. 2016; 161 (6): 785-8. (in Russian)

13. Belyaeva N.N., Vostrikova M.V., Yurchenko V.V., Mihajlova R.I., Kameneckaya D.B., Ryzhova I.A. Assessment of nanotubes impact on the organism of warm-blooded laboratory animals. *Nauchnyj vestnik YaNAO*. 2017; 96 (3): 79-81. (in Russian)
14. Pothmann D., Simar S., Schuler D., Dony E., Gaering S., Le Net J.L. Lung inflammation and lack of genotoxicity in the comet and micronucleus assays of industrial multiwalled carbon nanotubes C100 after a 90-day nose-only inhalation exposure of rats. *Part. Fibre Toxicol.* 2015; 12-21.
15. Wang H., Wang J., Deng X. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice *J. Nanosci Nanotech.* 2004; 4(8): 1019-23.
16. Mills N.L., Amin N., Robinson S.D. Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173 (4): 426-31.
17. Shvedova A.A., Kisin E.R., Porter D. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacol. Ther.* 2009;121 (2):192-204.
18. Belyaeva N.N. Morphofunctional investigation of the effects of short carbon nanotubes on the liver. The collection of materials Y111 from International Symposium "Human Ecology and biomedical public safety" (under the editorship of Y.A. Rahmanin) Hungary-Austria, from 20- 29 October.2012: 13-9.
19. Tabet L., Bussy C., Amara N. Adverse effects of industrial multi-walled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J. Toxicol. Environ Health.* 2009; 72 (2):60-73.
20. Hirano S., Kanno S., Furuyama A. Multiwalled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; 232 (2): 244-51.
21. Davoren M., Herzog E, Casey A. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. In Vitro.* 2007; 21 (3): 438-48.
22. Buford M.C., Hamilton J., Raymond F., Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 2007; 4: 6.
23. Masyutin A.G., Erohina M.V., Sychevskaya K.A., Gusev A.A., Avsyukova I.A., Tkachev A.G. i dr. Multi-walled carbon nanotubes induce pathological changes in digestive organs of mice. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny.* 2016; 161 (1): 143-8. (in Russian)
24. 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.
25. Folkmann J.K., Risom L., Jacobsen N.R., Wallin H., Loft S., Møller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117 (5): 703-8.
26. Szendi K., Varga C. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Res.* 2008; 28 (1A): 349-52.
27. Coyuco J.C., Liu Y., Tan B.J., Chiu G.N. Functionalized carbon nanomaterials: exploring the interactions with Caco-2 cells for potential oral drug delivery. *Int. J. Nanomedicine.* 2011; 6: 2253-63.
28. Cherukuri P., Gannon C.J., Leeuw T.K., Schmidt H.K., Smalley R.E., Curley S.A. et al. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *PNAS.* 2006; 103 (50): 18882-6.
29. Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A., Rieger N.A., Nikityuk D.B. Carbon nanotubes: mechanisms of action, biological markers and evaluation of toxicity in vivo. *Gigiena i sanitariya.* 2017; 2: 176-86.
30. Gorsheneva E.B. Dose-dependent effect of multiwall carbon nanotubes and soot particles when administered by the laboratory mice. *Nanotechnology and health.* 2014; 6 (1): 48-55. (in Russian)
31. Ubogov A.Yu., Polyakova I.A., Gusev, A.A., Gorsheneva E.B., Tkachev A.G. Carbon nanotubes as a factor in the development of inflammatory process in liver of mice. *The TSU;* 2011; 16 (5): 1338-42. (in Russian)

Поступила 12.03.2018

Принята к печати 18.10.2018

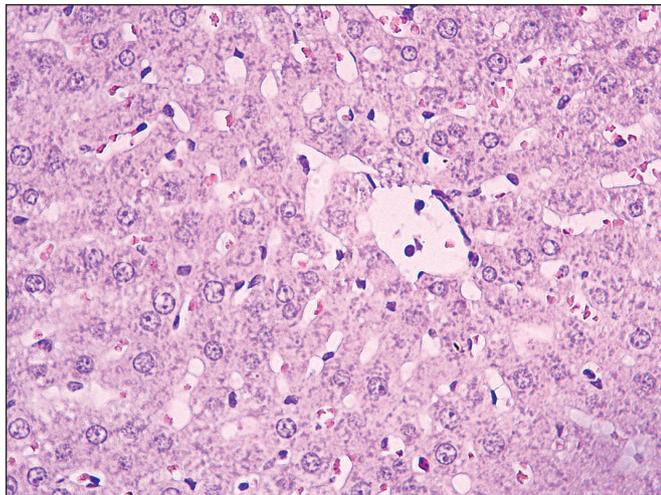


Рис. 1. Печень контрольной крысы (группа 1).
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .

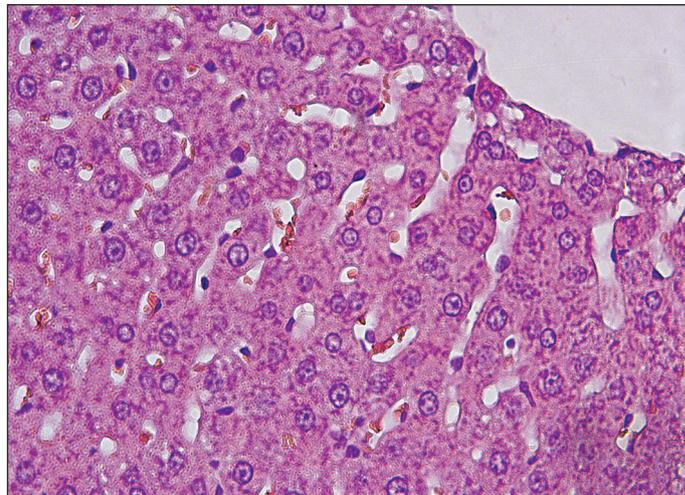


Рис. 2. Печень контрольной крысы (группа 2).
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .

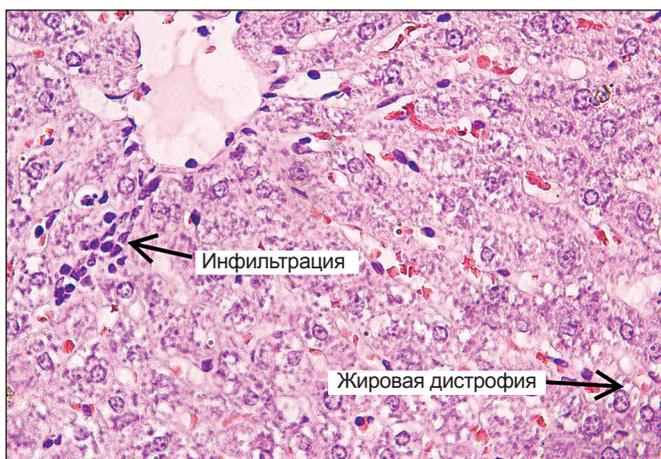


Рис. 3. Печень крысы при 2-х недельном воздействии оУНТ в дозе 0,5мг/кг (группа 4).
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .

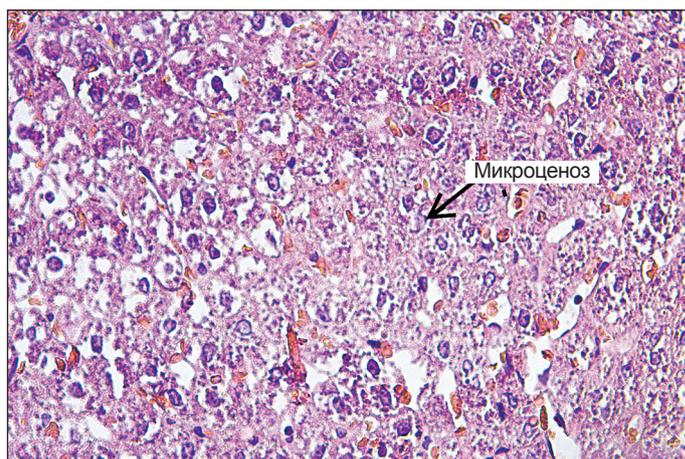


Рис. 4. Печень крысы 5-й группы при воздействии АЕ.
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .

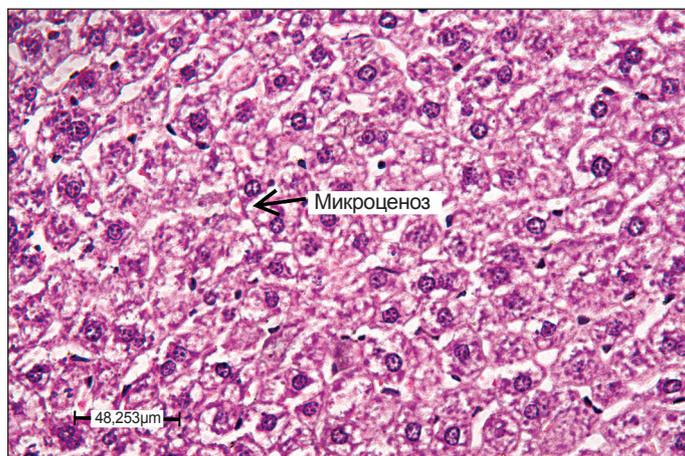


Рис. 5. Печень крысы 6-й группы при воздействии оУНТ в дозе 0,05 мг/кг и АЕ. Жировая дистрофия и микронекрозы гепатоцитов.
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .