

НЕЙРОКОГНИТИВНЫЕ СИСТЕМЫ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 615;616-009;616-092.9

ВЛИЯНИЕ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ИХ ОДНОКРАТНОМ ИНТРАФАРИНГЕАЛЬНОМ И ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ

© 2020 г. А. А. Анциферова^{1,2,*}, Г. А. Тимербулатова^{3,4}, Г. Ф. Габидинова³, Д. О. Никитин³,
А. М. Димиев⁵, Ш. Ф. Галялгдинов⁵, А. В. Вершинин⁶, П. К. Кашкаров^{1,2,7}, Л. М. Фатхутдинова³

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

³ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

⁴ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан), Казань, Россия

⁵ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁶ Центральная клиническая больница восстановительного лечения
Федерального медико-биологического агентства России, Голубое, Россия

⁷ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: antsiferova_aa@nrcki.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 22.06.2020 г.

Принята к публикации 22.06.2020 г.

Оценка токсического действия многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) на млекопитающих является важной задачей в связи с их распространенностью в качестве загрязнителя окружающей среды. В связи с этим исследовали их возможное влияние на поведенческие функции лабораторных мышей в тестах “Открытое поле”, “Вращающийся стержень” и “Крестообразный лабиринт”. Исследовали два возможных пути поступления нанотрубок в организм: интрафарингеальную аспирацию и внутривенное введение. Моделировали наиболее распространенный способ поступления УНТ – через легкие, а также при усвоении из крови через гистогематические барьеры. Для интрафарингеальной аспирации мышам однократно вводили 20 мкг потенциального токсина, а при внутривенном – 0.2 мкг. Оценивали острый и отсроченный эффекты через 24 ч и через 30 сут после введения для обоих типов поступления нанообъектов. Через 24 ч после интрафарингеальной аспирации УНТ у экспериментальной группы наблюдались скрытое эмоциональное напряжение и ослабление ориентировочно-исследовательских реакций. Через 30 сут также имели место признаки стресса. Через 24 ч после внутривенного введения нанотрубок фиксировалось, напротив, повышение двигательной активности и исследовательского поведения. Данный результат может быть объяснен угнетающим влиянием многостенных УНТ на нижние дыхательные пути и, возможно, отсутствием накопления в органах в связи с крупными размерами и невозможностью проникновения через гистогематические барьеры.

DOI: 10.1134/S1992722320020041

ВВЕДЕНИЕ

Производство углеродных нанотрубок (УНТ) неуклонно увеличивается в связи с растущими потребностями в строительстве, машиностроении, производстве энергии, освоении космоса и биомедицине [1]. В то же время эксперты и потребители поднимают во всем мире вопросы о безопасности УНТ. Эти углеродистые наноструктуры могут высвобождаться в воздух на рабочем месте во время производства и обработки, при

износе композитных материалов или в качестве побочных продуктов в различных технологических процессах. Загрязнение атмосферного воздуха УНТ может происходить в городских районах как часть сгорания моторного топлива [2]. Кроме того, УНТ и другие углеродные нанообъекты входят в состав продуктов горения древесины и вулканической деятельности. Потенциал УНТ исследуется в биомедицинских целях (биосенсоры, средства доставки) [3]. Все это делает очень важной оценку токсического воздействия

УНТ на биологические и экологические системы. Установление механизмов биологического и токсического действия УНТ при взаимодействии с различными биологическими объектами и организмом человека необходимо для последующей разработки подходов к техническому регулированию их содержания в различных объектах и предупреждению повреждающего действия на организм человека.

Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) производятся в промышленных масштабах и относятся к быстрорастущему сегменту рынка нанопродукции [4, 5]. Существует достаточное количество работ по оценке токсических эффектов МУНТ на различные системы организма [6–12], однако публикаций по их влиянию на нервную систему крайне мало.

Одно из косвенных доказательств того, что МУНТ не способны проникать через гистогематические барьеры организма, представлено в [13]. В данной работе исследовалось влияние МУНТ “Таунит-М” при хроническом 100-дневном пероральном пути их поступления на когнитивные функции крыс в тесте “Условный рефлекс пассивного избегания”. Препарат ежедневно давали растущим крысам-самцам линии Вистар в дозах от 0.01 до 10 мг/кг массы тела; введение МУНТ осуществляли с питьевой жидкостью в виде водных дисперсий, стабилизированных 1%-ным Tween-20. Никаких достоверных различий в когнитивных функциях по сравнению с контрольной группой выявлено не было. Отметим, что, несмотря на стабилизацию МУНТ поверхностно-активным веществом (ПАВ) Tween-20, при изменении pH такие нанобъекты способны к значительной агрегации, что реализуемо в кислой среде желудка и щелочной среде кишечника. Низкая проницаемость через естественные барьеры организма, безусловно, могла привести к редуцированию взаимодействия МУНТ с нервной системой и, соответственно, снижению пагубного влияния на последнюю.

При пероральном введении 0.3% коллоидного раствора МУНТ “Таунит” в более высокой дозировке (450 мг/кг) в течение 14 сут у лабораторных животных наблюдались увеличение спонтанной двигательной активности, количества локомоций и снижение порога эмоциональных реакций. Изменение поведенческих реакций сочеталось с морфофункциональными изменениями, что проявлялось в виде венозного полнокровия головного мозга, гипофиза и мозжечка [14].

В [15] показаны нейротоксическое действие МУНТ на синаптическую пластичность гиппокампа и пространственное познание у крыс при внутрибрюшинном введении. Использовался ин-

гибитор аутофагии – хлорохин, чтобы выяснить, играет ли аутофагия важную роль в синаптической пластичности гиппокампа, поврежденной МУНТ. Взрослые самцы крыс Вистар случайным образом были поделены на три группы: контрольную группу, группу, получавшую МУНТ (2.5 мг/кг массы тела в день), и группу, получавшую МУНТ в той же дозе и хлорохин (20 мг/кг массы тела в день). В качестве основы для приготовления суспензии использовался 0.1%-ный Tween-80. После двухнедельных внутрибрюшинных инъекций крысы проходили тест “Водный лабиринт Морриса”, у них определяли долгосрочное потенцирование и биохимические параметры. Было показано, что МУНТ могут вызывать когнитивный дефицит через увеличение уровня аутофагии.

В исследовании [16] при внутрибрюшинном введении МУНТ в дозах 80 и 800 мг/кг массы тела (стабилизация фосфатно-буферным раствором, pH 7.8) мышам NMRI, спустя две недели после однократного введения в экспонированных группах, по сравнению с контрольной группой отмечался повышенный уровень тревожности в тесте “Крестообразный лабиринт” и повышенный уровень депрессии в тесте “Вынужденное плавание”. В тесте “Открытое поле” время, проведенное в центре арены и на периферии, между группами не различалось. Экспрессия гена нейротрофического фактора мозга (BDNF) снизилась по сравнению с контролем в группе, получившей дозу МУНТ 80 мг/кг, но увеличилась в группе, получившей дозу МУНТ 800 мг/кг.

Таким образом, данные, полученные на основе экспериментов с пероральным или внутрибрюшинным поступлением МУНТ, неоднозначны. Необходимо отметить достаточно высокие дозировки, применявшиеся исследователями, что затрудняет распространение результатов на условия реальных экспозиционных сценариев. Вопрос о биораспределении МУНТ и возможности проходить через естественные барьеры организма остается открытым. Вполне возможно, что морфология МУНТ, включая значительный размер в одном измерении (длина в микрометровом диапазоне), затрудняет их проникновение через естественные барьеры организма и дальнейшую аккумуляцию в тканях. На этот вопрос дается косвенный ответ в представленной работе. Целью исследования явилась оценка влияния МУНТ при интрафарингеальном и внутривенном однократном введении в организм млекопитающих (мышей) на их поведенческие функции. Интрафарингеальная аспирация моделировала наиболее распространенный способ поступления МУНТ в организм. Внутривенное введение моделировало влияние поступившего в кровь ксено-

биотика. Такой путь может реализовываться при биомедицинском применении МУНТ. Кроме того, исследование внутривенного пути поступления токсина важно для сравнительного контроля результатов интрафарингеального эксперимента, так как убирает эффект легочного барьера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали влияние МУНТ “Таунит-М”, полученных непосредственно на предприятии по их производству в г. Тамбов, Россия. В соответствии с характеристикой производителя МУНТ “Таунит-М” имеет диаметр в диапазоне 10–30 нм, длину >2 мкм.

Многостенные углеродные нанотрубки предварительно подвергали термической обработке при 250°C в течение 30 мин. Приготовление суспензий проводили следующим образом: изначально готовили гомогенную суспензию МУНТ (1 мг/мл) в растворе ПАВ (0.1%-ный Tween-80 в фосфатно-буферном растворе) путем ультразвуковой соникации, затем путем разбавления получали рабочие концентрации: 0.5 мг/мл для интрафарингеального введения и 0.001 мг/мл для внутривенного введения. Для соникации растворов использовали прибор “Sonics” при следующих параметрах работы: 750 Ватт, 20 кГц, 40% амплитуда, пульс 5/6, время 30 мин. Подготовленные суспензии МУНТ тестировали на содержание бактериальных эндотоксинов; полученные результаты свидетельствовали об отсутствии бактериального загрязнения. Контроль степени диспергирования проводили при помощи просвечивающего электронного микроскопа Carl Zeiss Libra 120 с использованием программы Carl Zeiss AxioVision для компьютерной обработки изображений.

Размер МУНТ в суспензии определяли путем их визуализации с помощью просвечивающего/растрового электронного микроскопа (П/РЭМ) Titan 80-300 ТЕМ/STEM с разрешением 0.79 Å. Непосредственно перед измерением растворы МУНТ подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин, а затем высаживали на углеродную сетку и высушивали.

В работе использовали мышей-самцов линии C57BL6 в возрасте двух месяцев массой 18 ± 2 г. Всего в эксперименте участвовало 80 мышей: 40 контрольных и 40 экспериментальных.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

В каждом из экспериментов (интрафарингеальное и внутривенное введение) участвовало по 40 мышей – 20 опытных и 20 контрольных. По 10 лабораторных животных каждой из групп

(контрольной и опытной) исследовались через 24 ч и 30 сут после экспозиции.

Для интрафарингеального введения выбрана доза МУНТ, на которой были показаны токсические эффекты в отношении дыхательных путей по данным предыдущих исследований легочной токсичности МУНТ на животных [6–12].

Все растворы подвергали ультразвуковой диспергации непосредственно перед введением, чтобы избежать агрегации частиц МУНТ.

Первая экспериментальная группа получила путем фарингеальной аспирации 20 мкг МУНТ в 40 мкл 0.1%-ного раствора Tween-80 (1 мг/кг массы тела); первой контрольной группе тем же способом было введено 40 мкл 0.1%-ного Tween-80. Техника фарингеальной аспирации включала в себя наркотизацию животного с помощью изофлурана, фиксацию, осторожное вытягивание языка и однократное помещение необходимого объема исследуемого раствора в область корня языка для последующей рефлекторной аспирации животным.

В случае внутривенного пути поступления второй экспериментальной группе вводили 0.2 мкг МУНТ в 200 мкл 0.1%-ного раствора Tween-80 (0.01 мг/кг массы тела); второй контрольной группе тем же способом было введено 200 мкл 0.1%-ного Tween-80. Подбор дозы для внутривенного введения, эквивалентную интрафарингеальной дозе, проводили с учетом коэффициента транслокации 1% [17]. Внутривенную инъекцию проводили в боковую вену хвоста тонкой иглой. Для расширения вен хвост опускали в теплую воду (45–55°C); место укола высушивали и дезинфицировали; прокол делали по возможности периферийнее.

Все работы с животными проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и отвечали принципам надлежащей лабораторной практики [18]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанского ГМУ Минздрава России. Животные содержались в одиночных клетках при температуре помещения +20–26°C и относительной влажности воздуха не более 70%. Для кормления животных использовался овес, мука травяная “Веткорм”, комбикорм конвенциональный ПЗК-120 для лабораторных грызунов.

Поведенческие тесты проводили через 24 ч и 30 сут для каждого типа введения. Батарея поведенческих тестов включала в себя методы “Открытое поле”, “Вращающийся стержень”, “Крестообразный лабиринт”.

Для проведения теста “Открытое поле” использовали установку “Открытое поле для мышей”, круглое, цвет – серый, без разметки (НПК

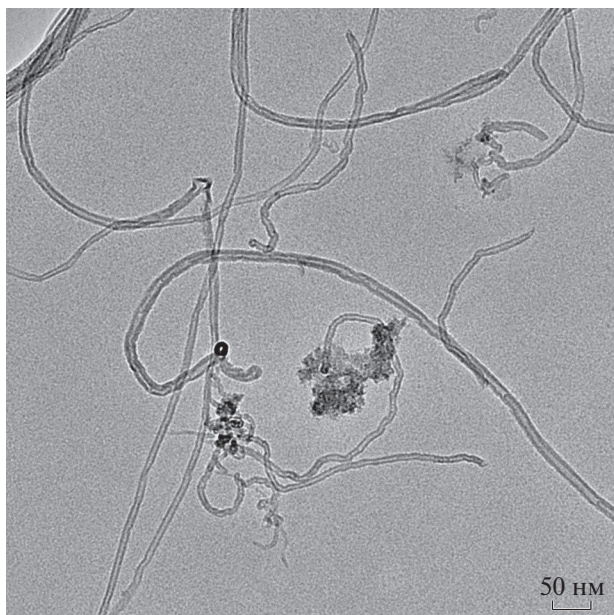


Рис. 1. П/РЭМ-изображение МУНТ “Таунит” (0.5 мг/мл), стабилизированных 0.1%-ным Tween-80 в фосфатно-буферном растворе.

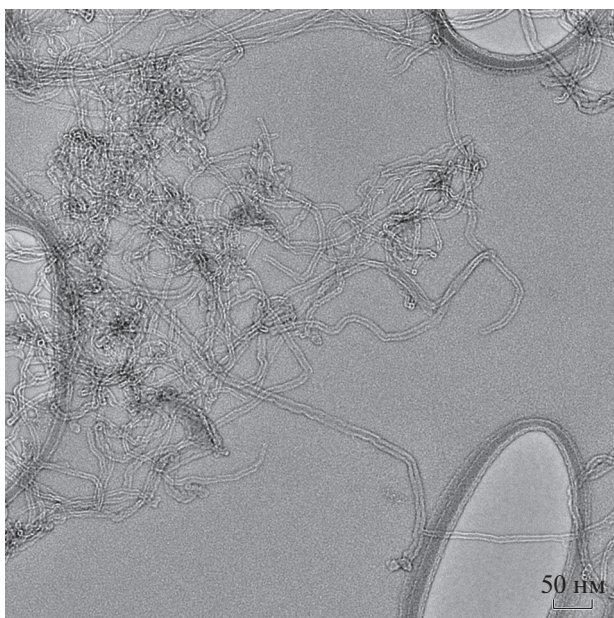


Рис. 2. П/РЭМ-изображение МУНТ “Таунит” (0.5 мг/мл), стабилизированных 0.1% Tween-80 в фосфатно-буферном растворе. Представлена область с высокой концентрацией МУНТ. Видно, что волокна весьма перепутаны.

Открытая Наука, Россия). Методика “Открытое поле” предназначена для изучения поведения грызунов в новых стрессогенных условиях и позволяет оценить уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного, стратегию ис-

следовательского поведения, симптомы неврологического дефицита. Животное помещалось в центр арены и находилось в установке в течение трех минут. Регистрировались такие показатели, как горизонтальная двигательная активность (количество пересеченных линий), горизонтальная двигательная активность в центре арены (количество посещений центральной части установки), количество обследованных норок, уровень дефекации.

Установка “Приподнятый крестообразный лабиринт” (НПК Открытая наука, Россия) позволяет более полно и детально регистрировать состояние поведения животных в условиях переменной стрессогенности с помощью оценки уровня тревожности по предпочтению темноты/света. Автоматическую регистрацию проводили при помощи специального программного обеспечения для видеотрекинга Etho Vision (фирма Noldus). Животные также помещались в центр лабиринта, их поведение регистрировалось в течение пяти минут. Учитывались время, проведенное в закрытых и открытых рукавах лабиринта, средняя скорость движения.

Также использовали вращающийся стержень (НПК “Открытая наука”, Россия), что позволило объективно оценить наличие мышечной релаксации, нарушения равновесия и координации движений. Скорость вращения стержня составляла 15 об./мин. Удержание мышей на стержне в течение двух минут считалось максимальным.

В каждом эксперименте сохраняли последовательность и интервал между поведенческими тестами. В первый день проводили тесты “Открытое поле” и “Вращающийся стержень”, причем мышей после проведения первого теста сразу помещали на стержень. На следующий день регистрировали поведение животных в установке “Приподнятый крестообразный лабиринт”.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета R. Для сравнения опытной и контрольной групп применяли критерий Манна–Уитни. При оценке взаимодействия факторов времени и введения МУНТ использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA; предварительно перед проведением теста выборки проверяли на соответствие нормальному распределению при помощи теста Шапиро–Уилка и на однородность дисперсии при помощи теста Левена; апостериорный анализ с использованием критерия Тьюки проводили при установлении статистически значимой разницы между группами в целом.

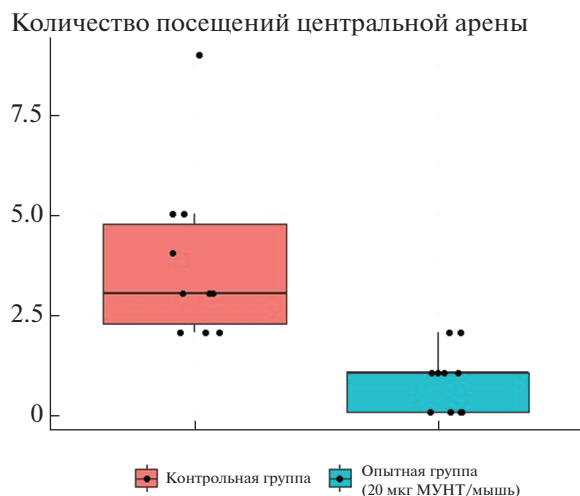


Рис. 3. Горизонтальная двигательная активность в центре арены в тесте “Открытое поле” через 24 ч после интрафарингеальной аспирации ($p < 0.001$).

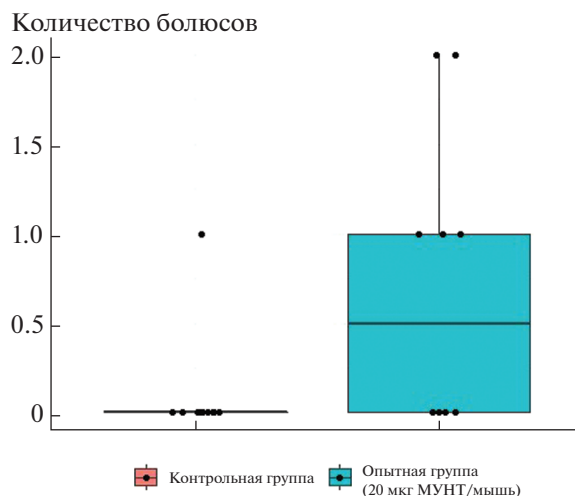


Рис. 5. Уровень дефекации мышей в тесте “Открытое поле” через 24 ч после интрафарингеальной аспирации ($p = 0.055$).

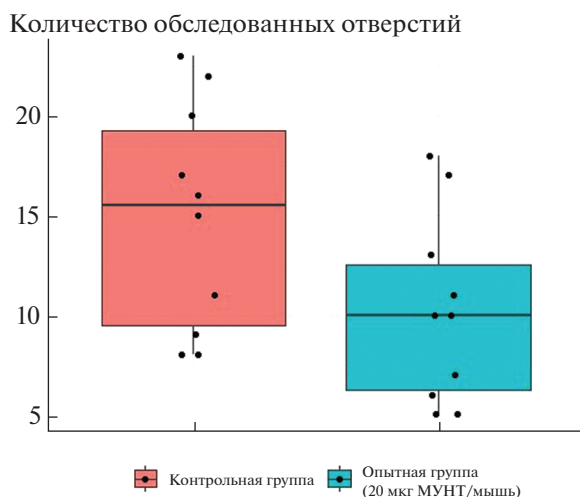


Рис. 4. Количество обследованных норок в тесте “Открытое поле” через 24 ч после интрафарингеальной аспирации ($p = 0.059$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Многостенные углеродные нанотрубки “Таунит-М”, согласно данным П/РЭМ, представляют собой переплетенные волокна длиной >2 мкм, толщиной 11 ± 2 нм (рис. 1) с остатками катализатора Co на концах. Также в качестве примесей, согласно данным энерго-дисперсионного рентгеновского микроанализа, обнаружены Fe и Mg, скорее всего, попавшие в порошок в процессе синтеза. Достоверно оценить продольный размер данных МУНТ не представлялось возможным в связи со значительной спутанностью волокон (рис. 2).

Преобладающий размер агломератов МУНТ в суспензии составлял 0.1–0.3 мкм.

Результаты поведенческих тестов приведены в табл. 1.

Использование метода “Открытое поле” в батарее тестов через 24 ч после интрафарингеальной экспозиции позволило обнаружить у опытной группы уменьшение двигательной активности в центре арены по сравнению с контрольной ($p < 0.001$) (рис. 3), что является признаком скрытого эмоционального напряжения у мышей, получивших дозу МУНТ. Кроме того, в этом же тесте выявлены следующие тенденции: мыши опытной группы обследовали меньше отверстий, чем мыши контрольной группы, что свидетельствует об ослаблении ориентировочно-исследовательских реакций у первых ($p = 0.059$) (рис. 4). Также опытная группа демонстрировала повышенный уровень дефекации по сравнению с контрольной группой, что, в свою очередь, свидетельствует о возросшем уровне тревожности ($p = 0.055$) (рис. 5).

Анализ поведенческих характеристик через 30 сут после экспозиции выявил статистически значимые различия в тесте “Крестообразный лабиринт”: общее время, проведенное в закрытых рукавах, у опытной группы было выше, чем у контрольной ($p = 0.052$) (рис. 6), что также является показателем повышенного уровня тревожности в незнакомой ситуации.

В тесте “Вращающийся стержень” мыши опытной группы не демонстрировали нарушения равновесия и координации движения по сравнению с контрольной группой через 24 ч и 30 сут после интрафарингеальной экспозиции.

Таблица 1. Результаты поведенческих тестов у мышей линии C57BL/6 через 24 ч и 30 дней после однократного интрафарингеального и внутривенного введения МУНТ (медиана [25, 75%])

| | “Открытое поле” | | | | “Вращающийся стержень” | | “Крестообразный лабиринт” | | |
|--|-------------------------------|--|------------------------------------|---|-------------------------------|--|--|---------------------------------|--|
| | Количество пересеченных линий | Количество посещений центральной арены | Количество обследованных отверстий | Уровень дефекации (количество боллусов) | Время удержания на стержне, с | Время, проведенное в открытых рукавах, с | Время, проведенное в закрытых рукавах, с | Средняя скорость движения, см/с | |
| Эксперимент 1. Интрафарингеальная аспирация (24 ч) | | | | | | | | | |
| Контрольная группа | 73.00 | 3.00 | 15.50 | 0.00 | 120.00 | 4.80 | 242.74 | 3.77 | |
| | [52.75, 85.25] | [2.25, 4.75]* | [9.50, 19.25]* | [0.00, 0.00]* | [100.00, 120.00] | [1.40, 28.82] | [165.95, 258.87] | [3.19, 4.43] | |
| Опытная группа (20 мкг МУНТ/мышь) | 59.50 | 1.00 | 10.00 | 0.50 | 120.00 | 2.80 | 235.25 | 2.97 | |
| | [36.50, 72.25] | [0.00, 1.00]* | [6.25, 12.50]* | [0.00, 1.00]* | [120.00, 120.00] | [0.12, 13.50] | [197.95, 253.42] | [2.68, 3.73] | |
| <i>p</i> | 0.13 | 0.0003* | 0.059* | 0.054* | 0.61 | 0.4 | 0.85 | 0.10 | |
| Эксперимент 1. Интрафарингеальная аспирация (30 сут) | | | | | | | | | |
| Контрольная группа | 57.00 | 2.00 | 13.00 | 0.00 | 14.00 | 0.00 | 202.85 | 2.72 | |
| | [37.50, 74.75] | [0.00, 5.75] | [9.25, 16.50] | [0.00, 1.50] | [4.50, 28.25] | [0.00, 1.60] | [155.42, 229.22]* | [2.23, 2.86] | |
| Опытная группа (20 мкг МУНТ/мышь) | 63.50 | 2.00 | 14.00 | 0.00 | 14.50 | 0.25 | 257.19 | 2.42 | |
| | [47.50, 71.50] | [1.00, 3.00] | [11.00, 17.00] | [0.00, 0.00] | [7.50, 32.75] | [0.00, 1.57] | [243.45, 267.35]* | [2.25, 2.71] | |
| <i>p</i> | 0.88 | 0.91 | 0.65 | 0.55 | 0.91 | 0.69 | 0.052* | 0.63 | |
| Эксперимент 2. Внутривенное введение (24 ч) | | | | | | | | | |
| Контрольная группа | 74.00 | 2.00 | 12.50 | 0.00 | 28.50 | 16.35 | 230.30 | 21.32 | |
| | [58.00, 80.00]* | [2.00, 3.75] | [10.50, 20.50] | [0.00, 0.00] | [3.25, 120.00] | [8.30, 24.50] | [215.02, 251.85] | [19.58, 24.51] | |
| Опытная группа (0,2 мкг МУНТ/мышь) | 87.50 | 3.00 | 15.00 | 0.00 | 66.00 | 12.30 | 249.00 | 20.36 | |
| | [84.50, 105.50]* | [1.25, 3.75] | [13.00, 17.25] | [0.00, 0.00] | [25.50, 79.75] | [4.97, 14.17] | [234.67, 254.75] | [19.70, 22.69] | |
| <i>p</i> | 0.015* | 0.70 | 0.59 | 0.5 | 0.59 | 0.19 | 0.14 | 0.63 | |
| Эксперимент 2. Внутривенное введение (30 сут) | | | | | | | | | |
| Контрольная группа | 29.00 | 1.00 | 9.00 | 0.00 | 12.00 | 66.70 | 144.00 | 21.54 | |
| | [22.00, 45.50] | [0.00, 2.00] | [3.50, 12.50] | [0.00, 0.75] | [3.25, 62.00] | [32.07, 93.20] | [105.22, 159.65] | [18.65, 25.32] | |
| Опытная группа (0,2 мкг МУНТ/мышь) | 33.00 | 2.00 | 4.00 | 0.00 | 18.00 | 69.10 | 124.30 | 20.60 | |
| | [18.00, 36.00] | [1.00, 2.00] | [1.00, 15.00] | [0.00, 2.00] | [4.00, 41.00] | [38.10, 72.90] | [82.30, 159.90] | [20.11, 23.10] | |
| <i>p</i> | 0.81 | 0.44 | 0.57 | 0.80 | 0.90 | 0.99 | 0.72 | 0.90 | |

* Достоверное отличие от контрольной группы, расчеты проводили с использованием критерия Манна–Уитни, при $p < 0.1$.

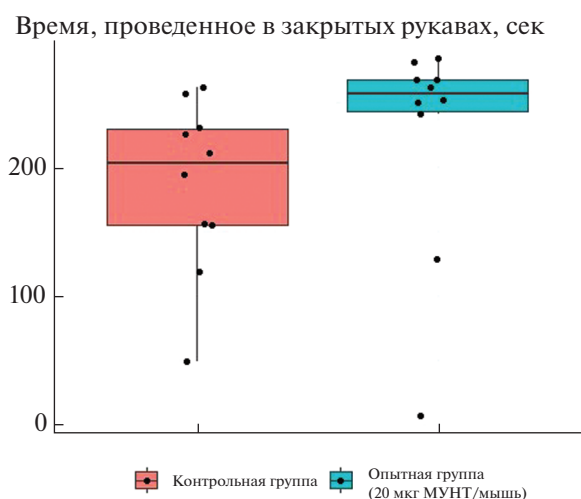


Рис. 6. Время, проведенное в закрытых лапах, в тесте “Крестообразный лабиринт” через 30 сут после интрафарингеальной аспирации ($p = 0.052$).

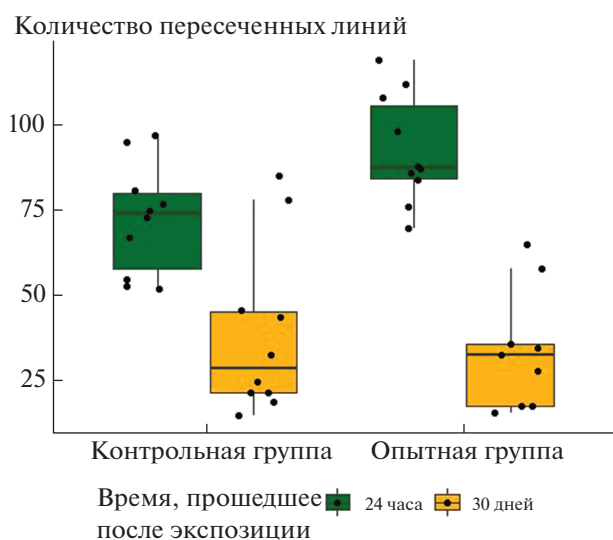


Рис. 7. Горизонтальная двигательная активность в тесте “Открытое поле” через 24 ч и 30 сут после внутривенной экспозиции (двухфакторный дисперсионный анализ, эффект взаимодействия – $p = 0.046$).

Через 24 ч после внутривенного введения МУНТ в тесте “Открытое поле” мыши опытной группы демонстрировали более высокую горизонтальную двигательную активность по сравнению с контрольной группой, а спустя 30 сут после воздействия результаты теста свидетельствовали о снижении горизонтальной двигательной активности мышей опытной группы в сравнении с контрольной (рис. 7). При использовании методов “Вращающийся стержень” и “Крестообразный лабиринт” статистически значимых различий между контрольными и опытными группами

через 24 ч и 30 сут после внутривенной экспозиции обнаружено не было.

Таким образом, спустя 30 сут после интрафарингеальной экспозиции в дозе 20 мкг/мышь различий в ориентировочно-исследовательских реакциях между опытной и контрольной группами, выявленных через 24 ч после введения МУНТ, не наблюдалось; при этом через 30 сут у опытной группы сохранялся повышенный уровень тревожности, более выраженный в условиях переменной стрессогенности. При внутривенном введении МУНТ в дозе 0.2 мкг/мышь признаки поведенческих нарушений регистрировались через 24 ч и 30 сут после воздействия только при оценке горизонтальной двигательной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования выявили некоторые поведенческие отклонения у опытной группы с интрафарингеальной экспозицией по сравнению с контрольной группой через 24 ч и 30 сут после введения МУНТ, что позволяет предположить наличие стресс-реакции со стороны нервной системы на введение суспензии МУНТ. По-видимому, полученные результаты свидетельствуют о раздражающем эффекте суспензии МУНТ на нижние отделы дыхательных путей. Возможно, данный результат связан не с проникновением МУНТ через легочный барьер и последующим их накоплением, а с реакцией на новый раздражитель. Однако это предположение должно быть верифицировано в токсикокинетическом исследовании по изучению биораспределения МУНТ в органах млекопитающих.

При внутривенном введении признаков негативного влияния на нервную систему в обеих группах не наблюдалось. Однако была зафиксирована повышенная двигательная активность по сравнению с контрольной группой в тесте “Открытое поле” через 24 ч с последующим торможением. Возбуждающее действие МУНТ на нервную систему было отмечено другими исследователями при пероральном [13–15] и внутрибрюшинном [16] путях введения значительно более высоких доз.

Необходимо учитывать фактор низкой дозы введенных МУНТ, а также их геометрии, которая приводит к затруднению прохождения через гистогематические барьеры организма. Оба этих фактора, по всей видимости, стали причиной незначительного влияния МУНТ на нервную систему. Однако при интрафарингеальном введении наблюдалось появление стресс-реакции, которая снижалась со временем, что, вероятно, связано с непосредственным контактом МУНТ с тканью легких и косвенно указывает на их естественное выведение с течением времени в составе бронхоальвеолярного лаважа. Отметим, что механизмы

воздействия МУНТ на нервную систему животных могут быть реализованы разными путями, и выраженная стресс-реакция в ответ на раздражение легочной ткани может маскировать другой механизм воздействия МУНТ, проявившийся в реакции со стороны нервной системы при внутреннем пути введения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-32-20197 мол_а_вед, частичное финансирование – грант № 19-315-90046).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ji Z., Zhang D., Li L. et al. // *Nanotechnology*. 2009. V. 20. № 44. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/44/445101>
2. Kolosnjaj-Tabi J., Just J., Hartman K.B. et al. // *EBio-Medicine*. 2015. V. 2. № 11. P. 1697.
3. Vardharajula S., Ali S.Z., Tiwari P.M. et al. // *Int. J. Nanomedicine*. 2012. V. 7. P. 5361.
4. Ткачев А.Г., Золотухин И.В. Аппаратура и методы синтеза твердотельных наноструктур: М.: Машиностроение-1. 2007. 316 с.
5. NIOSH Current intelligence bulletin 65. Occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/pdfs/2013-145.pdf?id=10.26616/NIOSH-PUB2013145> (дата обращения 20.06.2020).
6. Халиуллин Т.О., Шведова А.А., Кисин Е.Р. и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014. Т. 158. № 11. С. 635.
7. Dymacek J.M., Snyder-Talkington B.N., Raese R. et al. // *Int. J. Toxicol.* 2018. V. 37. № 4. P. 276.
8. Mercer R.R., Hubbs A.F., Scabilloni J.F. et al. // *Part Fibre Toxicol.* 2011. V. 8. № 21. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-21>
9. Muller J., Huaux F., Moreau N. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. V. 207. № 3. P. 221.
10. Nygaard U.C., Hansen J.S., Samuelsen M. et al. // *Toxicol. Sci.* 2009. V. 109. № 1. P. 113.
11. Poland C.A., Duffin R., Kinloch I. et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. № 7. P. 423.
12. Porter D.W., Hubbs A.F., Mercer R.R. et al. // *Toxicology*. 2010. V. 269. № 2–3. P. 136.
13. Шипелин В.А., Шумакова А.А., Масютин А.Г. и др. // *Российские нанотехнологии*. 2017. Т. 12. № 9–10. С. 96.
14. Горшенева Е.Б., Топчиева З.С. // *Вестн. российских университетов*. 2017. Т. 22. № 2. С. 274.
15. Gao J., Zhang X., Yu M. et al. // *Toxicology*. 2015. V. 337. P. 21.
16. Gholamine B., Karimi I., Salimi A. et al. // *Toxicol. Industrial Health*. 2016. V. 33. P. 340.
17. Jacobsen N.R., Møller P., Clausen P.A. et al. // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017. V. 121. Suppl. 3. P. 30.
18. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. Утв. Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. №544-ст. Доступ из справ.-правовой системы “ГАРАНТ”.