

**ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТАХ НА ТРЕВОЖНОСТЬ  
ПРИ НЕПРОДОЛЖИТЕЛЬНОМ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ  
ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК  
В ДВУХ НЕБОЛЬШИХ ДОЗАХ**

© 2022 г. Е. В. Лосева<sup>1</sup>, \* , Н. А. Логинова<sup>1</sup>, Л. И. Руссу<sup>2</sup>, М. В. Мезенцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского  
Минздрава России, Москва, Россия*

\*E-mail: losynd@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 14.09.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Углеродные нанотрубки (УНТ) очень перспективны для использования в разных областях деятельности человека, в том числе и в медицине, но могут оказывать негативное воздействие на организм, в частности на нервную систему. УНТ в больших дозах в экспериментах на животных часто вызывают тревожно-депрессивные расстройства. Влияние малых доз УНТ на поведение животных мало изучено. В настоящей работе исследовали показатели поведения в тестах на тревожность у крыс, которым интраназально ежедневно в течение 4 дней вводили взвесь однослойных углеродных нанотрубок (ОСУНТ) в небольших дозах — 5.2 или 52 мкг/кг. Оказалось, что обе дозы ОСУНТ однонаправленно изменяли следующие показатели поведения у крыс: в тесте “открытое поле” снижалась исследовательская активность (стойки), в тесте “свет–темнота” увеличивались латентный период захода в темный отсек и выглядывания из него, в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) активировалось поведение в открытом рукаве. Однако, если доза 5.2 мкг/кг вызывала у крыс поведение с признаками ажитации (в тестах “свет–темнота” и ПКЛ усиление исследовательской активности, а в тесте ПКЛ и двигательной активности при частых посещениях разных отсеков лабиринта), то доза 52 мкг/кг, наоборот, тормозила ряд поведенческих реакций, что выражалось в усилении тревожности (увеличение показателей замирания в открытом поле и ПКЛ) и увеличении латентного периода входа в закрытый рукав ПКЛ. Предполагается, что разные небольшие дозы ОСУНТ, попадая при интраназальном введении в мозг крыс, могут неодинаково нарушать структурно-функциональное состояние клеток нервной ткани и/или вызывать нейровоспаление в структурах, задействованных в механизмах тревожности и сопутствующих состояний, в результате чего по-разному изменяется и поведение крыс в тестах на тревожность.

*Ключевые слова:* однослойные углеродные нанотрубки, небольшие дозы, интраназальное введение, поведение крыс, тест “открытое поле”, тест “свет–темнота”, тест “приподнятый крестообразный лабиринт”

DOI: 10.31857/S086981392211005X

В настоящее время отмечается бурный рост производства углеродных нанотрубок (УНТ), которые, обладая уникальными свойствами — значительно повышенной электро- и теплопроводностью, прочностью, гибкостью и другими, востребованы в самых различных областях деятельности человека и очень перспективны для медицины. В экспериментальных работах *in vivo* и *in vitro* было показано, что УНТ могут быть использованы для адресной доставки лекарств и биологически-активных веществ для диагностики и лечения опухолевых процессов, для регенерации тканей, для усиления механических свойств имплантатов [1, 2]. Они могут применяться для создания биосенсорных систем [3], а также быть задействованы в генной терапии и тканевой инженерии. В нейромедицине на УНТ возлагают надежды для лечения опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний [4, 5]. Нанотрубки можно использовать как основу для роста нервных волокон при повреждениях мозга. В их присутствии ускоряется рост и дифференцировка нейральных стволовых клеток [6]. В области инсульта мозга в присутствии гидрофобных УНТ улучшается дифференцировка трансплантированных прогениторов из субвентрикулярной зоны [7]. УНТ бывают однослойные и многослойные. В России особое внимание уделяют производству однослойных углеродных нанотрубок (ОСУНТ) [8]. Однако вместе с развитием производства углеродных нанотрубок возрастает возможность их негативного воздействия на здоровье человека и среду его обитания. В группы риска попадают не только работники, задействованные в производстве УНТ, и население, проживающее недалеко от таких производств, но и потребители продукции, содержащей УНТ. Токсичное влияние УНТ на организм животных активно исследуется, данные противоречивы, и неполная ясность в этом вопросе тормозит использование УНТ в медицинской практике. Из обстоятельного обзора по токсичности ОСУНТ у лабораторных животных известно, что у грызунов при ингаляциях, глоточной аспирации и интратрахеальном введении ОСУНТ наибольшее токсическое воздействие оказывается на легкие и, как следствие, приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям. При инъекциях они проникают в разные органы и ткани, в том числе и мозг, задерживаются в легких, селезенке и печени и выводятся через почки и желчные протоки. Предполагается, что при пероральном введении ОСУНТ всасываются из желудочно-кишечного тракта в кровотока у крыс и мышей [9]. При однократном интратрахеальном введении коротких и длинных ОСУНТ в больших дозах (0.2–1 мг/кг) у крыс были обнаружены патологические изменения в легких даже через 104 нед. [10]. Многочисленные токсические эффекты на плаценту и потомство были обнаружены при введении УНТ беременным самкам мышей [11]. На модельном объекте (пекарские дрожжи — *Saccharomyces cerevisiae*) было показано, что ОСУНТ могут прямо или путем эндоцитоза проникать в клетки и распространяться в цитоплазме, везикулах, лизосомах и клеточных ядрах. Кроме того, ОСУНТ (188.2 и 376.4 мг/л) могут вызывать апоптоз в клетках дрожжей, в активации которого участвует окислительный стресс [12].

Особое внимание уделяется нейротоксичности наноматериалов [13]. Так, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что под действием УНТ в больших дозах могут развиваться нейродегенеративные процессы, тормозиться клеточная пролиферация, усиливаться апоптоз, развиваться оксидативный стресс, снижаться мембранный потенциал митохондрий, усиливаться перекисное окисление липидов, подавляться функции астроцитов, нарушаться поведенческие реакции [14]. Данные о поведении животных под действием УНТ немногочисленны и противоречивы. Так, длительное пероральное введение крысам разных доз (0.01; 0.1; 1 и 10 мг/кг) многослойных углеродных нанотрубок (МСУНТ) приводило к снижению массы тимуса и увеличению массы головного мозга и надпочечников, но не влияло на уровень тревожности и когнитивные показатели при выработке условного рефлексивного избегания [15]. В другой работе при получении МСУНТ (в дозе 500 мг/кг) с

пищей у крыс показана динамика увеличения тревожности и снижения исследовательской активности в тесте “открытое поле” [16]. Усиление тревожно-депрессивного поведения было показано и у детенышей при внутрибрюшинном введении разных доз (1–10 мг/кг) МСУНТ и ОСУНТ беременным мышам [17, 18]. Внутрибрюшинные инъекции МСУНТ и ОСУНТ в дозах 80 и 800 мг/кг также приводили к тревожно-депрессивному поведению взрослых мышей [19]. Нейротоксичность, главным образом, была продемонстрирована при использовании больших доз УНТ. Как влияют небольшие дозы УНТ на поведение животных, мало изучено. Появилась работа, в которой МСУНТ вводили мышам однократно в малых дозах – 20 мкг при фарингеальной аспирации и 0.2 мкг внутривенно. Было показано, что через 24 ч в открытом поле при интрафарингеальной аспирации у мышей развивалось эмоциональное напряжение и ослабление ориентировочно-исследовательских реакций, тогда как при внутривенном введении, наоборот, повышалась двигательная и исследовательская активность [20].

Интраназальное введение низкомолекулярных веществ и различных частиц, в том числе и наноматериалов считают наиболее эффективным путем для их доставки в мозг через обонятельную луковицу со слабым гематоэнцефалическим барьером [21, 22]. Есть надежда успешно доставлять в мозг лекарственные пептиды с помощью нанотрубок [23]. Ранее мы показали, что однократное интраназальное введение крысам взвеси ОСУНТ в малой дозе (4 мкг/кг) через сутки приводило к угнетению продукции мРНК большинства цитокинов в селезенке, а также к снижению суммарной активности транскрипции цитокинов в селезенке и мозге, то есть оказывало иммуносупрессивный эффект. При этом наблюдалось усиление экспрессии раннего гена *c-fos* в обонятельной луковице и тесно связанной с ней пириформной области неокортекса, то есть происходила активация этих структур мозга [24]. Мы предположили, что ОСУНТ в небольших дозах при интраназальном введении могут частично проникать в клетки мозга и, благодаря своим уникальным свойствам (сверхпрочности, повышенными электро- и теплопроводности) нарушать их структурно-функциональную целостность, что может привести к нейродегенеративным процессам и нейровоспалению и, как следствие, к изменению поведения животных. Поэтому в данном исследовании было решено использовать две небольшие дозы ОСУНТ для проверки влияния их непродолжительного интраназального введения на поведение крыс в тестах на тревожность.

**Задача** настоящей работы состояла в сравнительном анализе показателей поведения крыс в тестах на тревожность – “открытое поле”, “свет–темнота”, “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) – при непродолжительном интраназальном введении ОСУНТ в двух небольших дозах (5.2 или 52 мкг/кг).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 25 крысах-самцах Вистар с массой тела 230–280 г. Животные были разделены на 3 группы. Крысам двух экспериментальных групп по разработанной нами ранее методике [24] вводили интраназально один раз в день (в течение 4 дней) по 100 мкл взвеси двух доз ОСУНТ – 5.2 мкг/кг (доза 1) или 52 мкг/кг (доза 2) в физиологическом растворе (ФР) (группы ОСУНТ-1,  $n = 9$  и ОСУНТ-2,  $n = 8$  соответственно). Контролем служили крысы, которым аналогично раз в день (в течение 4 дней) интраназально вводили по 100 мкл ФР (группа Контроль,  $n = 8$ ).

В настоящем исследовании была использована паста к-ОСУНТ-90А (производство “Углерод ООО Чг”), любезно предоставленная А.В. Крестининым (Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия). Эту пасту мы использовали и в предыдущей работе, где подробно описаны ее характеристики [24]. Про-

центное содержание ОСУНТ (диаметр – 1.4–1.6 нм, длина – 0.5–1.5 мкм) в твердой фазе в пасте составляло более 90%. После автоклавирования при 1 атм и 120°C в течение 30 мин из 1 г пасты была приготовлена 1%-ная взвесь ОСУНТ в 100 мл физиологического раствора (ФР) (0.9%-ный NaCl), которую затем разводили в 1000 раз (для получения дозы 1) или в 100 раз (для получения дозы 2). Для однократного введения использовали по 100 мкл каждого раствора, что в перерасчете на массу тела крыс составляло 5.2 или 52 мкг/кг соответственно.

Для исследования показателей поведения всех крыс оценивали в общепринятых в мировой практике тестах на тревожность – “открытое поле”, “свет–темнота”, “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) [25]. Для регистрации показателей поведения во всех тестах использовали компьютерную программу RealTimer, разработанную ООО “НПК Открытая Наука” (Россия). Тест “открытое поле” выполняли через сутки после 1-го введения препаратов (ОСУНТ в обеих дозах или ФР), тест “свет–темнота” – через сутки после 3-го, а тест ПКЛ – через сутки после 4-го введения препаратов. То есть, препараты вводили непродолжительно в течение всех поведенческих экспериментов. Более продолжительное интраназальное введение ОСУНТ и оценка его влияния на поведение животных планируется нами в будущем. Особенности использованных поведенческих установок подробно описаны нами ранее [26]. Тест в каждой установке проводили в течение 5 мин для каждой крысы.

Для проведения теста “открытое поле” использовали квадратную камеру (100 × 100 см), пол которой разделен на 25 квадратов (20 × 20 см) – 1 центральный, 8 медиальных, 14 периферических, а высота стенок составляла 40 см. Крыс сажали на периферию открытого поля боком к стенке камеры. Определяли латентные периоды (с) выхода в центральный квадрат и медиальную зону, число пересеченных центрального, медиальных и периферических квадратов, а также общее число пересеченных квадратов. Кроме того, подсчитывали число актов, общую продолжительность (с) и среднюю продолжительность (с) стоек, груминга (умываний и чесаний отдельно) и принюхивания, число периодов неподвижности и замираний (подавление всех движений, кроме дыхательных), а также их общую и среднюю продолжительность (с). Полагают, что чем больше выходов в медиальные и центральный квадраты и продолжительность нахождения в них, тем меньше выражена тревожность, и наоборот.

Для выполнения теста “свет–темнота” использовали стандартную установку, состоящую из светлого и темного отсеков с отверстием в перегородке. Животных сажали в светлый отсек (СО) камеры хвостом к отверстию. Определяли латентные периоды (с) входа в темный отсек (ТО) и выхода в СО, первого выглядывания и вытягивания из ТО; число выходов в СО, продолжительность (с) пребывания в СО при выходах из ТО. Также оценивали число, общую и среднюю продолжительность (с) актов груминга, выглядывания (только весь нос и часть головы или голова) и вытягивания (задние лапы в ТО, голова и передние лапы в СО) из ТО. Кроме того, измеряли число, общую и среднюю продолжительность (с) стоек с опорой и без опоры, всех стоек, а также стоек до первого захода в ТО и при выходах из него в СО. Кроме того, определяли число болюсов в ТО и СО. Считается, что чем больше времени крыса находится в светлом отсеке камеры и выглядывает из темного отсека, тем меньше уровень тревожности.

Для проведения теста ПКЛ использовали установку “Приподнятый крестообразный лабиринт” (НПК Открытая Наука, Россия). Крыс помещали в центр камеры боками к закрытым рукавам (ЗР). Регистрировали латентный период (с) первого захода в ЗР и латентный период (с) первого выхода в открытый рукав (ОР). Каждый рукав делили на 3 квадрата – ближний, средний и дальний от центра лабиринта. Регистрировали число разных пересеченных квадратов в ОР и ЗР, число и время (с)

посещений центральной зоны, число заходов в ЗР и выходов в ОР, а также общую и среднюю продолжительность (с) пребывания в них. Кроме того, определяли число актов, общую и среднюю продолжительность (с) стоек, груминга (умываний и чесаний отдельно), принюхивания, выглядывания из ЗР (только весь нос и часть головы или голова), вытягивания (задние лапы в ЗР, голова и передние лапы в центре или в ОР), свешивания с ОР. Также оценивали число периодов, общее и среднее время (с) замирания и неподвижности. Кроме того, определяли число болюсов в разных отсеках ПКЛ – ЗР, ОР и центре. Принято считать, что чем больше времени крыса проводит в открытом рукаве и выглядывает из закрытого рукава, тем она менее тревожна (если не увеличена общая двигательная активность).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИВНД и НФ РАН (протокол № 3 от 10.07.2020 г.).

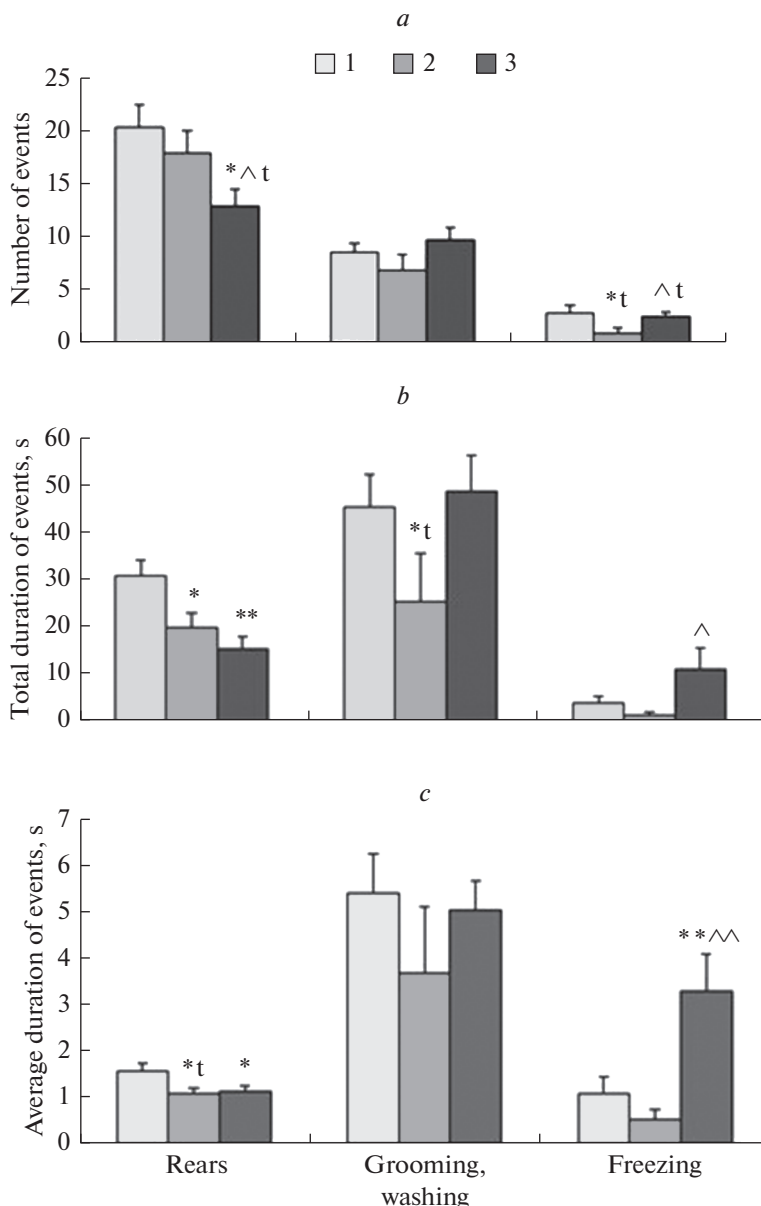
Для проверки выборок показателей поведения на нормальность распределения был проведен анализ Колмогорова–Смирнова. Поскольку большинство выборок не имело нормального распределения, статистический анализ показателей поведения во всех тестах был проведен с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса для нескольких независимых переменных (альтернатива однофакторного межгруппового ANOVA) с последующим сравнением по критерию Манна–Уитни, используя программу STATISTICA 7.0. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$  и на уровне статистической тенденции при  $p < 0.1$ . По критерию Манна–Уитни проверяли межгрупповые отличия только по тем показателям, в которых были выявлены статистически значимые или в виде тенденции отличия по критерию Краскела–Уоллиса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте “открытое поле” дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые или в виде тенденции отличия между тремя группами крыс по числу стоек ( $H(2.25) = 5.73, p = 0.06$ ), их общей и средней продолжительности (с) ( $H(2.25) = 7.85, p = 0.02$  и  $H(2.25) = 5.11, p = 0.08$  соответственно); по числу замираний ( $H(2.25) = 5.49, p = 0.06$ ), их общей и средней продолжительности (с) ( $H(2.25) = 8.46, p = 0.01$  и  $H(2.25) = 10.87, p = 0.01$  соответственно); по общей и средней продолжительности (с) умываний ( $H(2.25) = 5.96, p = 0.05$  и  $H(2.25) = 4.67, p = 0.09$  соответственно). Сравнение групп по критерию Манна–Уитни проводили только по этим показателям. Результаты этого анализа представлены на рис. 1.

Было обнаружено, что в тесте “открытое поле” число стоек уменьшалось только в группе ОСУНТ-2 ( $p = 0.03$ ), а общее время стоек и средняя продолжительность акта стойки уменьшались в обеих группах – ОСУНТ-1 ( $p = 0.02$  и  $p = 0.06$  соответственно) и ОСУНТ-2 ( $p = 0.01$  и  $p = 0.04$  соответственно). По показателям груминга снижалось общее время умывания только в группе ОСУНТ-1 ( $p = 0.1$ ). Остальные показатели груминга в обеих группах не изменялись. Число замираний снижалось в группе ОСУНТ-1 ( $p = 0.09$ ), а общая и средняя их продолжительность возрастала в группе ОСУНТ-2 ( $p = 0.07$  и  $p = 0.01$  соответственно).

Таким образом, в тесте “открытое поле” в группе ОСУНТ-1, по сравнению с контролем, уменьшались общая и средняя продолжительность стоек, длительность умываний и число замираний. В группе ОСУНТ-2 уменьшались число, общая и средняя продолжительность стоек, и увеличивались общая и средняя продолжительность акта замирания. То есть группы, получавшие разные дозы ОСУНТ, отличались от контроля по-разному. При этом у группы ОСУНТ-2, по сравнению с



**Рис. 1.** Сравнение некоторых показателей поведения у групп крыс Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 в тесте “открытое поле”.

Показатели поведенческих реакций: стоек (Rears), умываний (Grooming, washing) и замираний (Freezing), по которым выявлены статистически значимые ( $p < 0.05$ ) или в виде тенденции ( $p < 0.1$ ) различия между группами крыс по критерию Краскела–Уоллиса. Группы крыс: 1 – Контроль ( $n = 8$ ), 2 – ОСУНТ-1 ( $n = 9$ ). 3 – ОСУНТ-2 ( $n = 8$ ). Описание групп дано в разделе “Методика исследования”. (a) Число стоек, умываний и замираний. (b) Общая продолжительность тех же событий, с. (c) Средняя продолжительность тех же событий, с. Данные представлены в  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . \*\* –  $p < 0.01$  и \* –  $p < 0.05$  – различия статистически значимы или  $*t - p < 0.1$  – на уровне статистической тенденции по сравнению с группой Контроль; ^^ –  $p < 0.01$ , ^ –  $p < 0.05$  – различия статистически значимы или  $^t - p < 0.1$  на уровне тенденции по сравнению с группой ОСУНТ-1. Критерий Манна–Уитни.

группой ОСУНТ-1, было меньше число стоек ( $p = 0.08$ ), но больше число ( $p = 0.09$ ), общая ( $p = 0.04$ ) и средняя ( $p = 0.01$ ) продолжительность замираний.

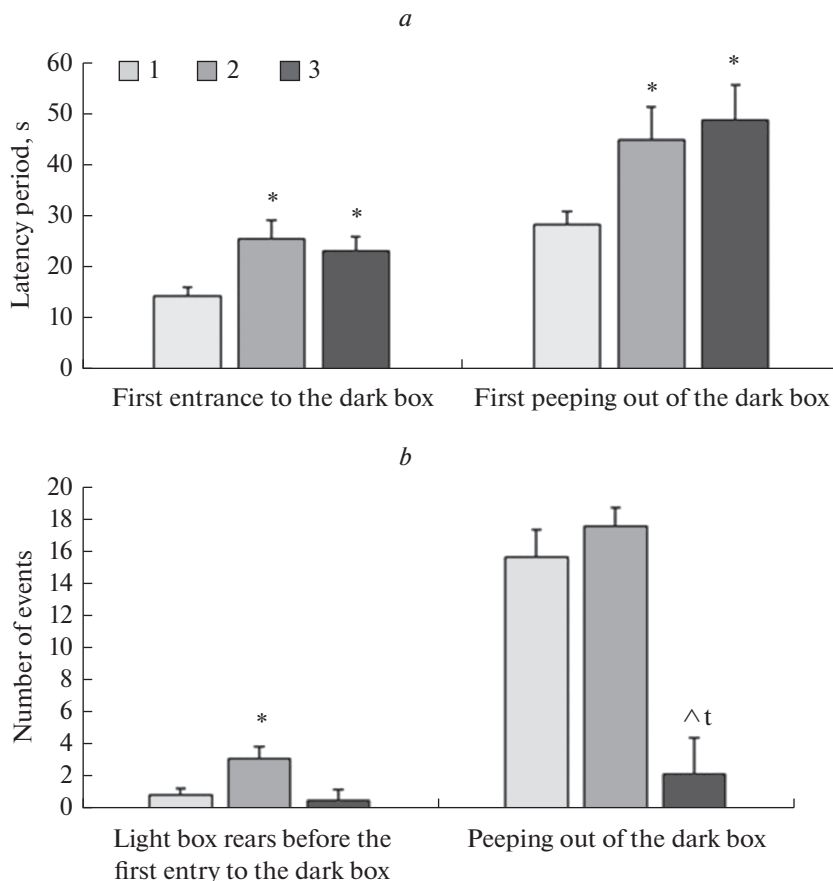
То есть группа ОСУНТ-2 демонстрировала в открытом поле более тревожное поведение по сравнению с контролем (больше общая и средняя продолжительность замираний) и с группой ОСУНТ-1 (больше все показатели замираний). В группе ОСУНТ-1 число замираний и длительность умываний, по сравнению с контролем, снижались, следовательно по этим признакам тревожность была меньше. В то же время, вертикальная исследовательская активность (показатели стоек) уменьшалась на фоне обеих доз ОСУНТ, но в группе ОСУНТ-2 в большей степени, чем в группе ОСУНТ-1.

В тесте “свет–темнота” дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые или в виде тенденции отличия между группами Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 по числу стоек до первого входа в темный отсек (ТО) ( $H(2.25) = 6.52, p = 0.04$ ) и их средней продолжительности (с) ( $H(2.25) = 4.88, p = 0.09$ ); по числу выглядываний из ТО ( $H(2.25) = 4.94, p = 0.09$ ); по латентным периодам (с) входа в ТО ( $H(2.25) = 8.49, p = 0.01$ ) и выглядывания из ТО ( $H(2.25) = 6.95, p = 0.03$ ). Сравнение групп по критерию Манна–Уитни проводили только по этим показателям. Результаты этого анализа представлены на рис. 2.

В тесте “свет–темнота” по сравнению с контролем, в группах ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 увеличивались латентные периоды первого входа в ТО ( $p = 0.04$  и  $p = 0.05$  соответственно) и выглядываний из него ( $p = 0.05$  и  $p = 0.05$  соответственно) (рис. 2а). При этом в группе ОСУНТ-1 увеличивалось число стоек до первого входа в ТО ( $p = 0.05$ ). Группа ОСУНТ-2, по сравнению с группой ОСУНТ-1, меньшее количество раз выглядывала из ТО ( $p = 0.08$ ) (рис. 2б). По остальным показателям значимых различий между группами не обнаружено. Однако следует отметить, что только по критерию Манна–Уитни средняя продолжительность периода нахождения в ТО была меньше в группе ОСУНТ-1, по сравнению с группой Контроль ( $p = 0.04$ ) и больше в группе ОСУНТ-2, по сравнению с группой ОСУНТ-1 ( $p = 0.08$ ).

Итак, после помещения в камеру “свет–темнота” обе группы крыс, получавших ОСУНТ, долго не заходили в темный отсек, а группа ОСУНТ-1 (но не ОСУНТ-2) еще и делала при этом много стоек, демонстрируя повышенную вертикальную исследовательскую активность, а также у нее был меньше средний период посещения ТО. Обе группы дольше, чем в контроле, в первый раз не выглядывали из ТО, а группа ОСУНТ-2 еще и меньше раз выглядывала из ТО. То есть, обе экспериментальные группы крыс, наряду с повышенной активностью в СО, которая проявлялась в большей степени в группе ОСУНТ-1, демонстрировали тревожное поведение в ТО, которое проявлялось в большей степени в группе ОСУНТ-2.

Для теста ПКЛ результаты сравнения по критерию Манна–Уитни тех показателей поведения, которые по критерию Краскела–Уоллиса показали статистически значимые или в виде тенденции различия между группами Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2, представлены в табл. 1. Далее проанализированы межгрупповые сравнения этих показателей по критерию Манна–Уитни. Оказалось, что в группе ОСУНТ-1, по сравнению с контролем, увеличивалось число посещений центра, но уменьшалось среднее время пребывания в нем, увеличивалось число заходов в ЗР и выходов в ОР. В группе ОСУНТ-2, по сравнению с контролем, не изменялось число посещений центра и ЗР, а в ОР этот показатель увеличивался. При этом общая продолжительность пребывания увеличивалась в ОР, а среднее время пребывания уменьшалось в центре и увеличивалось в ОР. Латентные периоды первого посещения ОР уменьшались в обеих группах с ОСУНТ, но в группе ОСУНТ-2 это уменьшение было выражено гораздо в большей степени (ОСУНТ-1 –  $p = 0.06$ , ОСУНТ-2 –  $p = 0.01$ ). При этом латентный период первого посещения ЗР был значительно увеличен только в группе ОСУНТ-2. При определении двигательной активности в



**Рис. 2.** Анализ некоторых показателей поведения у групп крыс Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 в тесте “свет–темнота”.

Показатели поведения, по которым обнаружены статистически значимые ( $p < 0.05$ ) или в виде тенденции ( $p < 0.1$ ) различия между группами крыс по критерию Краскела–Уоллиса. Группы крыс: 1 – Контроль ( $n = 8$ ), 2 – ОСУНТ-1 ( $n = 9$ ), 3 – ОСУНТ-2 ( $n = 8$ ). Описание групп дано в разделе “Методика исследования”. (а) Латентные периоды событий – первого входа в темный отсек (ТО) и первого выглядывания из ТО, с. (б) Число событий – стоек до первого входа в ТО и выглядываний из ТО. Описание групп дано в разделе “Методика”. Данные представлены в  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . \* –  $p < 0.05$  – различия статистически значимы по сравнению с группой Контроль; <sup>^t</sup> –  $p < 0.1$  различия на уровне статистической тенденции по сравнению с группой ОСУНТ-1. Критерий Манна–Уитни.

ПКЛ было обнаружено больше пересечений центральной зоны и ближних квадратов в ОР только у группы ОСУНТ-1. В группе ОСУНТ-2 эти показатели, по сравнению с контролем, не изменялись. В группах ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2, по сравнению с контролем, была увеличена средняя продолжительность стоек. При этом у крыс из группы ОСУНТ-2 увеличивались число и общая продолжительность замираний, а увеличение среднего времени акта замирания приблизилось к уровню статистической тенденции ( $p = 0.11$ ).

При сравнении групп, получавших ОСУНТ, оказалось, что группа ОСУНТ-2 меньше раз и времени посещала центр, и меньше раз посещала ЗР, чем группа



Таблица 1. Показатели поведения у групп крыс Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ)

Показатели поведения	Результаты непараметрического критерия Краскела—Уоллиса	Контроль, n = 8		ОСУНТ-1, n = 9		ОСУНТ-2, n = 8	
		m ± SEM	p	m ± SEM	p	m ± SEM	p
Число событий, шт.							
Посещения центра	H (2.25) = 4.94, p = 0.08	4.9 ± 1.3		8.9 ± 1.2	p < 0.1*	5.9 ± 1.0	p < 0.1^
Посещения закрытых рукавов (ЗР)	H (2.25) = 5.09, p = 0.08	3.9 ± 0.9		6.6 ± 1.0	p < 0.05*	3.6 ± 0.7	p < 0.1^
Пересечения ближних квадратов в ЗР	H (2.25) = 4.66, p = 0.09	10.2 ± 2.1		14.1 ± 2.0		8.0 ± 1.6	p < 0.1^
Сумма квадратов в ЗР	H (2.25) = 4.98, p = 0.08	29.5 ± 5.2		36.9 ± 4.2		22.38 ± 4.1	p < 0.1^
Посещения открытых рукавов (ОР)	H (2.25) = 5.15, p = 0.08	0.9 ± 0.5		2.3 ± 0.5	p < 0.1*	2.1 ± 0.4	p < 0.1*
Пересечения ближних квадратов в ОР	H (2.25) = 5.28, p = 0.07	1.3 ± 0.7		3.4 ± 0.8	p < 0.1*	2.8 ± 0.4	
Умывания	H (2.25) = 4.87, p = 0.09	4.4 ± 1.2		1.3 ± 0.8	p < 0.1*	2.9 ± 1.0	
Замирания	H (2.25) = 5.47, p = 0.06	0.0 ± 0.0		0.2 ± 0.2		0.6 ± 0.3	p < 0.05*
Болосы в ЗР	H (2.25) = 7.93, p = 0.02	3.1 ± 0.5		0.8 ± 0.4	p < 0.01*	1.4 ± 0.6	p < 0.05*
Болосы в центре	H (2.25) = 6.95, p = 0.03	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.4 ± 0.2	p < 0.05^
Общая продолжительность событий, с							
Нахождение в центре	H (2.25) = 5.34, p = 0.07	31.1 ± 4.8		37.5 ± 7.4		17.2 ± 4.7	p < 0.1^
Нахождение в ОР	H (2.25) = 5.62, p = 0.06	11.3 ± 6.2		30.7 ± 7.6		39.9 ± 10.3	p < 0.05*
Замирание	H (2.25) = 5.91, p = 0.05	0.0 ± 0.0		0.2 ± 0.2		8.1 ± 4.6	p < 0.1*; p < 0.05^
Средняя продолжительность событий, с							
Нахождение в центре	H (2.25) = 8.77, p = 0.01	9.0 ± 2.2		3.9 ± 0.6	p < 0.01**	3.2 ± 0.6	p < 0.05*
Нахождение в ОР	H (2.25) = 5.6, p = 0.06	7.2 ± 4.3		11.1 ± 2.7		21.4 ± 5.6	p < 0.1*; p < 0.1^
Стойка	H (2.25) = 7.88, p = 0.02	1.0 ± 0.1		1.5 ± 0.1	p < 0.1*	1.5 ± 0.2	p < 0.05*
Замирание	H (2.25) = 5.91, p = 0.05	0.0 ± 0.0		0.2 ± 0.2		7.7 ± 4.7	p < 0.05^
Латентные периоды, с							
Вход в ЗР	H (2.25) = 7.26, p = 0.03	9.1 ± 2.8		17.9 ± 6.9		39.8 ± 9.8	p < 0.05*; p < 0.05^
Выход в ОР	H (2.25) = 14.66, p = 0.001	179.9 ± 43.8		78.0 ± 41.6	p < 0.1*	3.5 ± 0.5	p < 0.01*

Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (m ± SEM). Статистически значимые (p < 0.01, p < 0.05) или в виде статистической тенденции (p < 0.1) отличия: \* – по сравнению с группой “Контроль”; ^ – по сравнению с группой ОСУНТ-1. Критерий Манна–Уитни.

ОСУНТ-1. Суммы пересечений квадратов в ЗР и пересечений всех квадратов (в ОР, ЗР и центре) по критерию Манна–Уитни,  $p = 0.08$  у группы ОСУНТ-2 были меньшими, чем в группе ОСУНТ-1. Кроме того, в группе ОСУНТ-2 были большими общее и среднее время замираний, а увеличение числа замираний приблизилось к уровню тенденции ( $p = 0.11$ ).

Таким образом, группа ОСУНТ-1 демонстрировала повышенную активность в тесте ПКЛ, что выражалось в частом посещении всех рукавов камеры и центральной зоны, в повышенной двигательной и вертикальной исследовательской активности. В противоположность этому, в группе ОСУНТ-2 наблюдалась активность, характеризующаяся уменьшением нахождения в центре, но увеличением показателей пребывания в ОР, увеличением всех показателей замираний, при этом латентный период выхода в ОР был очень мал, а первого посещения ЗР очень велик, по сравнению с контролем и группой ОСУНТ-1. То есть, животные группы ОСУНТ-2 после помещения в центр сразу же выходили в СО и долго не заходили в ТО. Совокупность показателей поведения в группе ОСУНТ-2 может свидетельствовать не только об увеличении тревожно-подобного поведения у крыс, но и о торможении их способности адекватно оценить обстановку в ПКЛ, и соответственно снижению скорости принятия решения быстро спрятаться в ТО от света, как обычно поступают животные контрольной группы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, наше предположение о нарушении поведения крыс в тестах на тревожность под действием непродолжительного интраназального введения ОСУНТ в небольших дозах подтвердилось. Однако изменения показателей поведения под влиянием ОСУНТ в дозах 1 (5.2 мкг/кг) и 2 (52 мкг/кг) были большей частью не одинаковы.

Так, в группе ОСУНТ-1, которой вводили интраназально ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, при сравнении с контролем, по показателям груминга и замираний снижалась тревожность, а по показателям стоек уменьшалась исследовательская активность в тесте “открытое поле”. В тестах “свет–темнота” и ПКЛ наблюдали также усиление исследовательской и двигательной активности, а в тесте ПКЛ еще и частые перебежки из одного отсека в другой. При этом животные больше времени, чем в контроле, проводили в светлых отсеках камер “свет–темнота” и ПКЛ, что может указывать на снижение тревожности (анксиолитический эффект) [27]. Однако хорошо известно, что анксиолитики не вызывают беспорядочную двигательную активность, которая наблюдалась в группе ОСУНТ-1, а наоборот, снижают ее, поэтому говорить об анксиолитическом действии ОСУНТ в данном случае не корректно. Вероятнее всего, в тесте ПКЛ у крыс, получавших 5.2 мкг/кг ОСУНТ в течение 4 дней и демонстрирующих увеличение двигательной и исследовательской активности, частые беспорядочные побежки в разные отсеки, длительное пребывание в светлых отсеках, мы имеем дело с ажитацией, пространственной дезориентацией и нерациональной поисковой активностью.

Для ориентации в пространстве важную роль играют несколько областей неокортекса (теменная, ретроспленальная и префронтальная), гиппокамп и некоторые другие структуры мозга. Механизмы дезориентации в пространстве активно изучаются [28]. Известно, что ажитация может сопровождаться дисбалансом основных нейромедиаторных систем и чрезмерной активацией лимбико-ретикулярных структур мозга при недостаточности контроля коры [29]. Кроме того, при ажитации у больных психозами изменяются уровни цитокинов в сыворотке крови [30], что свидетельствует о важной роли иммунной системы в ее механизмах. Согласно нашим предыдущим данным, при однократном интраназальном введении крысам

взвеси ОСУНТ в сходной малой дозе (4 мкг/кг) через сутки наблюдалось усиление экспрессии раннего гена *c-fos* в лимбических структурах – обонятельной луковицы и пириформной области неокортекса, свидетельствующее об их активации [24]. Кроме того, в той же работе было показано иммуносупрессивное влияние ОСУНТ в дозе 0.4 мкг/кг через сутки после введения на экспрессию мРНК большинства цитокинов (интерферонов  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , интерлейкинов 1 $\beta$ , 2, 5, 6, 8, 13, 17, фактора некроза опухолей  $\alpha$ ) в селезенке, при этом в мозге снижалась суммарная экспрессия генов цитокинов [24]. Можно предположить, что в настоящей работе у крыс, получавших ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг в течение 4 дней, также имели место активация обонятельной луковицы, пириформной коры и снижение иммунного ответа, что могло привести к ажитации некоторых поведенческих реакций у этой группы животных. Не исключено, что при этом имел место и дисбаланс нейромедиаторных систем мозга. Дальнейшие иммуногистохимические, иммунологические и биохимические исследования влияния малых доз ОСУНТ на нервную и иммунную системы помогут разобраться в правомерности этих предположений.

При интраназальном введении большей дозы ОСУНТ (52 мкг/кг) крысы из группы ОСУНТ-2, так же как из группы ОСУНТ-1, много времени проводили в светлых помещениях камер “свет–темнота” и ПКЛ. Но в группе ОСУНТ-2 были выявлены и другие изменения в структуре поведения, по сравнению с группой ОСУНТ-1. Во всех тестах у этих крыс не повышалась двигательная и исследовательская активность. Наоборот, в тесте “свет–темнота” были выражены признаки тревожного поведения, а в тестах “открытое поле” и ПКЛ – тревожного и депрессивного поведения. В тесте ПКЛ в группе ОСУНТ-2 также был очень длительный латентный период захода в закрытый рукав и увеличивались, как и в тесте “открытое поле”, показатели замираний. Это может свидетельствовать о том, что скорость оценки обстановки и принятия адекватного решения у этих животных снизилась, а тревожность усилилась. Возможно, они испытывали больший стресс в ПКЛ, чем контрольные крысы. Мы предполагаем, что интраназальное введение ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг могло привести к нарушению целостности и функциональной активности клеток в структурах мозга, ответственных за механизмы оценки обстановки и принятия решения, например, хабенулу [31], орбитофронтальную кору [32, 33], стриатум [34]. При этом могло измениться и морфофункциональное состояние стресс-реактивных структур [35].

Следует отметить, что на некоторые сходные по природе поведенческие реакции в настоящей работе ОСУНТ оказывали разнонаправленное влияние в разных тестах. Например, в открытом поле все показатели стоек снижались на фоне обеих доз ОСУНТ, однако в тесте “свет–темнота” число стоек до первого входа в темный отсек увеличивалось на фоне ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, а в тесте ПКЛ увеличивалась средняя продолжительность стоек на фоне обеих доз ОСУНТ. Такие разнонаправленные изменения могут быть связаны с разными сроками проведения тестов и с разными дозировками введенных к этим срокам ОСУНТ. Так, тест “открытое поле” проводили через сутки после однократного введения ОСУНТ, а тесты “свет–темнота” и ПКЛ, где направленность изменений этих показателей была сходной – через сутки после трех- и четырехкратного введения ОСУНТ. Сходным образом латентный период входа в темный отсек светло-темной камеры увеличивался по сравнению с контролем, на фоне обеих доз ОСУНТ, а латентный период входа в темный рукав ПКЛ увеличивался только на фоне ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг. То есть, направленность изменений была сходна в обоих этих тестах, проведенных с интервалом всего один день и на фоне ежедневного введения трех или четырех порций обеих доз ОСУНТ. Из литературы известно, что комплексное исследование поведения крыс в трех тестах на тревожность (“открытое поле”, “свет–темнота”, ПКЛ) по множеству показателей позволяет достаточно полно дать оценку их эмо-

циональному состоянию [25]. В этой работе все три установки были соединены между собой, и все три теста проводили в течение 15 мин, последовательно по 5 мин на каждый тест, то есть условия проведения тестов были максимально унифицированы. Возможно, использование в нашей работе такой модели позволило бы избежать в разных тестах, проведенных одновременно, разнонаправленных изменений некоторых поведенческих реакций под влиянием интраназального введения, например, четырехкратно разных доз ОСУНТ.

Нарушения поведения, полученные в данной работе, возможно, связаны с тем, что ОСУНТ могут оказывать на клетки мозга значительное воздействие. Так, обнаружено, что субстрат из ОСУНТ может поддерживать и стимулировать электрическую активность в сетях культивируемых нейронов гиппокампа, соединяясь с ними [36]. Это может быть связано со способностью ОСУНТ образовывать тесные контакты с мембранами нейронов [37]. Возможно, что и в нашей работе электропроводность клеток мозга за счет соединившихся с ними ОСУНТ тоже могла увеличиться. При этом мог нарушиться баланс возбуждения и торможения, необходимый для адекватной работы нервной системы. Не исключено, что, благодаря большой теплопроводности ОСУНТ, температура мозга в их присутствии также может увеличиваться.

Известно, что УНТ могут проникать в клетки и клеточные органеллы – лизосомы, митохондрии, ядра, механически нарушая целостность их мембран [38, 39]. В опытах на культуре клеток микроглии было показано, что МСУНТ дозозависимо нарушают пролиферацию и миграцию микроглии, препятствуют фагоцитарной активности этих клеток и вызывают их апоптоз [40]. Показано, что МСУНТ могут вызывать в мозге нейровоспаление, сопровождающееся активацией астроцитов [41].

Предполагается, что в нашей работе ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, попадая в мозг, могут увеличивать его электрическую и тепловую проводимость. Это может быть одной из причин повышенной активации поведенческих реакций в группе ОСУНТ-1. Но количества ОСУНТ в этой дозе недостаточно, чтобы повредить значительное число клеток мозга. В то же время ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг, попадая в мозг, могли не только изменить электро- и теплопроводность ткани, но и значительно повредить клетки мозга и вызвать в нем воспалительную реакцию, отсюда выраженное тревожное поведение и снижение скорости адекватной оценки обстановки и принятия решения в группе ОСУНТ-2. Подтвердить или опровергнуть эти предположения могут помочь дальнейшие морфофункциональные исследования мозга крыс, получавших ОСУНТ в разных небольших дозах в течение разных интервалов времени.

Литературные данные свидетельствуют о том, что токсические эффекты нанотрубок зависят от многих факторов – их размеров, склонности к агрегации, химического состава поверхности, растворимости в воде, введенной дозы, способа введения и так далее [42, 43]. Например, чем лучше дисперсированы УНТ и меньше их размеры, тем менее проявляется токсичность [44, 45]. Поскольку УНТ очень перспективны для использования в медицине и биологии, наряду с работами по выявлению их токсичности ведется активный поиск способов ее уменьшения. Например, создаются функционализированные УНТ, поверхность которых покрывается биосовместимыми молекулами – белками, РНК, ДНК, углеводами. Такие УНТ обладают меньшим повреждающим действием на клетки, чем очищенные [46, 47]. Именно функционализированные УНТ с большой вероятностью будут применяться в медицинской практике, в том числе и в нейромедицине. В нашей работе были использованы карбоксилированные очищенные ОСУНТ (диаметр – 1.4–1.6 нм, длина – 0.5–1.5 мкм), поэтому, вероятно, даже небольшие их дозы при интраназальном введении привели к нарушению поведения крыс в тестах на тревожность. Возможно, что ОСУНТ, поверхность которых покрыта биосовместимыми молеку-

лами, не оказали бы сходного эффекта на поведение крыс при том же способе введения и тех же дозах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В тесте “открытое поле” крысы через сутки после однократного введения обеих доз ОСУНТ демонстрировали снижение исследовательской активности (стойки). При этом крысы, которым вводили ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг меньше умывались, меньше замирали, а при введении ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг среднее время замираний, наоборот, увеличивалось.

В тесте “свет–темнота” крысы через сутки после трехкратного введения ОСУНТ в обеих дозах, по сравнению с контролем, позже в первый раз посещали темный отсек и выглядывали из него. При этом у крыс, получавших ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, сокращалось среднее время пребывания в темном отсеке и возрастало число стоек в светлом отсеке перед первым заходом в темный отсек (исследовательская активность).

В тесте “ПКЛ” у крыс через сутки после четырехкратного введения обеих доз ОСУНТ наблюдалась активация поведения в открытом рукаве, что выражалось в более частом и длительном его посещении, чем в контроле. Под влиянием ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг также увеличивалась вертикальная исследовательская активность (стойки), двигательная активность (пересечения квадратов) и частые перебежки в разные рукава, а под влиянием ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг при увеличении длительности замираний наблюдался долгий латентный период захода в закрытый рукав, но очень быстрый латентный период выхода в открытый рукав.

Таким образом, даже непродолжительное интраназальное введение ОСУНТ в небольших дозах может изменить поведение крыс в тестах на тревожность, причем по ряду показателей эти изменения разные для исследованных доз. Обе дозы ОСУНТ вызывали, по сравнению с контролем, в тесте “открытое поле” снижение исследовательской активности (стойки), в тесте “свет–темнота” увеличение латентного периода захода в темный отсек, в ПКЛ активацию поведения в открытом рукаве. При этом на фоне ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг у крыс в тестах “свет–темнота” и ПКЛ наблюдалась ажитация некоторых поведенческих реакций (усиление двигательной активности при частых посещениях разных отсеков камер, увеличение исследовательской активности). В то же время на фоне ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг наблюдалось тревожное поведение (увеличение длительности замираний в тестах “открытое поле” и ПКЛ), и уменьшалась скорость оценки обстановки и принятия адекватного решения, свойственного крысам, спрятаться от света в темноту (поздний первый заход в темные рукава ПКЛ). Предполагается, что изменения в поведении крыс могли быть связаны с тем, что после интраназального введения ОСУНТ частично попадают в мозг, приводя в разных дозах к разной степени нарушения структурно-функционального состояния клеточных элементов и/или нейровоспалению в областях, ответственных за адекватное поведение в тестах на тревожность.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 годы.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.В.Л., М.В.М.), подготовка разных доз взвеси ОСУНТ (Л.И.Р., М.В.М), сбор поведенческих данных (Н.А.Л., Е.В.Л.), обработка данных (Н.А.Л.), написание манускрипта (Е.В.Л.), редактирование манускрипта (Н.А.Л., М.В.М.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saito N, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Hara K, Takanashi S, Shimizu M, Narita N, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Kato H, Nishimura N, Taruta S, Endo M* (2014) Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. *Chem Rev* 114(11): 6040–6079.  
<https://doi.org/10.1021/cr400341h>
2. *Rezvoval MA, Nikishau PA, Makarevich MI, Glushkova TV, Klyshnikov KY, Akentieva TN, Efimova OS, Nikitin AP, Malysheva VY, Matveeva VG, Senokosova EA, Khanova MY, Danilov VV, Rusakov DM, Ismagilov ZR, Kostjuk SV, Ovcharenko EA* (2022) Biomaterials Based on Carbon Nanotube Nanocomposites of Poly(styrene-*b*-isobutylene-*b*-styrene): The Effect of Nanotube Content on the Mechanical Properties, Biocompatibility and Hemocompatibility. *Nanomaterials* 12(5): 733.  
<https://doi.org/10.3390/nano12050733>
3. *Heller D, Jin H, Martinez B. Patel D, Miller BM, Yeung T-K, Jena PV, Höbartner C, Ha T, Silverman SK, Strano MS* (2009) Multimodal optical sensing and analyte specificity using single-walled carbon nanotubes. *Nat Nanotech* 4: 114–120.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.369>
4. *Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu RI* (2019) Neuronanomedicine: An Up-to-Date Overview. *Pharmaceutics* 11(3): E101.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030101>
5. *Vidu R, Rahman M, Mahmoudi M, Enachescu M, Poteca TD, Opris I* (2014) Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. *Front Syst Neurosci* 8: 91.  
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00091>
6. *Bokara KK, Kim JY, Lee YI, Yun K, Webster TJ, Lee JE* (2013) Biocompatibility of carbon nanotubes with stem cells to treat CNS injuries. *Anat Cell Biol* 46(2): 85–92.  
<https://doi.org/10.5115/acb.2013.46.2.85>
7. *Moon SU, Kim J, Bokara KK, Kim JY, Khang D, Webster TJ, Lee JE* (2012) Carbon nanotubes impregnated with subventricular zone neural progenitor cells promotes recovery from stroke. *Int J Nanomed* 7: 2751–2765.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S30273>
8. *Krestinin AV, Dremova NN, Knerel'man EI, Blinova LN, Zhigalina VG, Kiselev NA* (2015) Characterization of SWCNT products manufactured in Russia and the prospects for their industrial application. *Nanotechnol Russ* 10: 537–548.  
<https://doi.org/10.1134/S1995078015040096>
9. *Ema M, Gamo M, Honda K* (2016) A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 74: 42–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.015>
10. *Honda K, Naya M, Takehara H, Kataura H, Fujita K, Ema M* (2017) A 104-week pulmonary toxicity assessment of long and short single-wall carbon nanotubes after a single intratracheal instillation in rats. *Inhal Toxicol* 29(11): 471–482.  
<https://doi.org/10.1080/08958378.2017.1394930>
11. *Ema M, Gamo M, Honda K* (2016) Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* 299: 47–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.015>
12. *Zhu S, Luo F, Li J, Zhu B, Wang GX* (2018) Biocompatibility assessment of single-walled carbon nanotubes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *J Nanobiotechnol* 16: 44.  
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0370-1>
13. *Bencsik A, Lestaavel P, Guseva Canu I* (2018) Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. *Prog Neurobiol* 160: 45–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.003>
14. *Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu RI* (2019) Neurotoxicity of Nanomaterials: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)* 9(1): E96.  
<https://doi.org/10.3390/nano9010096>
15. *Shipelin VA, Shumakova AA, Masyutin AG, Chernov AI, Sidorova YuS, Gmoshinski IV, Khotimchenko SA* (2017) In Vivo Subacute Oral Toxicity Assessment of Multiwalled Carbon Nano-

- tubes: Characteristic of Nanomaterial and Integral Indicators. *Nanotechnol Russ* 12(9-10): 559–568.  
<https://doi.org/10.1134/S199507801705010X>
16. *Sayapina NV, Batalova TA, Perel'man YM, Kuznetsov VL, Chaika VV, Sergievich AA, Golokhvast KS, Kolosov VP* (2015) Multi-walled carbon nanotubes increase anxiety levels in rats and reduce exploratory activity in the open field test. *Dokl Biol Sci* 464(1): 223–225.  
<https://doi.org/10.7868/S0869565215250283>
  17. *Ivani S, Karimi I, Tabatabaei SR* (2012) Biosafety of multiwalled carbon nanotube in mice: a behavioral toxicological approach. *J Toxicol Sci* 37(6): 1191–1205.  
<https://doi.org/10.2131/jts.37.1191>
  18. *Ivani S, Karimi I, Tabatabaei SR., Syedmoradi L* (2016) Effects of prenatal exposure to single-wall carbon nanotubes on reproductive performance and neurodevelopment in mice. *Toxicol Ind Health* 32 (77): 1293–1301.  
<https://doi.org/10.1177/0748233714555388>
  19. *Gholamine B, Karimi I, Salimi A, Mazdarani P, Becker LA* (2017) Neurobehavioral toxicity of carbon nanotubes in mice. *Toxicol Ind Health* 33(4): 340–350.  
<https://doi.org/10.1177/0748233716644381>
  20. *Antsiferova AA, Timerbulatova GA, Gabidinova GF, Nikitinc DO, Dimieve AM, Galyaltdinove ShF, Vershininf AV, Kashkarova PK, Fatkhutdinova LM* (2020) The Influence of Multiwalled Carbon Nanotubes on the Behavior of Mammals after Single Intraparyngeal or Intravenous Exposure. *Nanotechnol Russ* 15(2): 241–247.  
<https://doi.org/10.1134/S1995078020020044>
  21. *Loseva E, Yuan TF, Karnup S* (2009) Neurogliogenesis in the mature olfactory system: a possible protective role against infection and toxic dust. *Brain Res Rev* 59(2): 374–387.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.10.004>
  22. *Md S, Mustafa G, Baboota S, Ali J* (2015) Nanoneurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 41(12): 1922–1934.  
<https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1052081>
  23. *Kumar A, Pandey AN, Jain SK* (2016) Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv.* 23(3): 681–693.  
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.920431>
  24. *Loseva EV, Mezentseva MV, Russu LI, Loginova NA, Panov NV, Shchetvin MN, Suetina IA* (2016) Suppression of cytokine synthesis in spleen and brain and small changes in c-fos expression in rat brain after intranasal administration of single-walled carbon nanotubes. *Nanotechnol Russ* 11(3–4): 237–246.  
<https://doi.org/10.1134/S1995078016020129>
  25. *Ramos A, Pereira E, Martins GC, Wehrmeister TD, Izidio GS* (2008) Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav Brain Res* 193(2): 277–288.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.007>
  26. *Loseva EV, Loginova NA, Sarkisova KY, Klodt PM, Narkevich VB, Kudrin VS* (2018) Behavioral Symptoms of Anxiety and Depression and Brain Monoamine Contents in Rats after Chronic Intranasal Administration of Interferon- $\alpha$ . *Neurosci Behav Physi* 48(8): 954–962.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-018-0655-8>
  27. *Walf AA, Frye ChA* (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2: 322–328.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
  28. *Grigoryeva VN, Tikhomirov GV* (2019) Topographic Disorientation in Patients with Brain Damage. *Neurosci Behav Physi* 49: 929–936.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00821-0>
  29. *Carrarini C, Russo M, Dono F, Barbone F, Rispoli MG, Ferri L, Di Pietro M, Digiovanni A, Ajdinaj P, Speranza R, Granzotto A, Frazzini V, Thomas A, Pilotto A, Padovani A, Onofrij M, Sensi SL, Bonanni L* (2021) Agitation and Dementia: Prevention and Treatment Strategies in Acute and Chronic Conditions. *Front Neurol* 12: 644317.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.644317>
  30. *Larsen JB, Stunes AK, Vaaler A, Reitan SK* (2019) Cytokines in agitated and non-agitated patients admitted to an acute psychiatric department: A cross-sectional study. *PLoS One* 14(9): e0222242.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222242>
  31. *Stopper CM, Floresco SB* (2014) What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci* 17(1): 33–35.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3587>

32. *Funahashi S* (2017) Prefrontal contribution to decision-making under free-choice conditions. *Front Neurosci* 11: 431.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00431>
33. *Vertechi P, Lottem E, Dario S, Godinho B, Treves I, Quendera T, Lohuis MNO, Mainen ZF* (2020) Inference-Based Decisions in a Hidden State Foraging Task: Differential Contributions of Prefrontal Cortical Areas. *Neuron* 106(1): 166–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.017>
34. *Amemori K, Amemori S, Gibson DJ, Graybiel AM* (2018) Striatal microstimulation induces persistent and repetitive negative decision-making predicted by striatal beta-band oscillation. *Neuron* 99(4): 829–841.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.022>
35. *McEwen BS, Nasca C, Gray JD* (2016) Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 41(1): 3–23.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
36. *Mazzatenta A, Giugliano M, Campidelli S, Gambazzi L, Businaro L, Markram H, Prato M, Ballerini L* (2007) Interfacing neurons with carbon nanotubes: electrical signal transfer and synaptic stimulation in cultured brain circuits. *J Neurosci* 27(26): 6931–6936.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007>
37. *Cellot GI, Cilia E, Cipollone S, Rancic V, Sucapane A, Giordani S, Gambazzi L, Markram H, Grandolfo M, Scaini D, Gelain F, Casalis L, Prato M, Giugliano M, Ballerini L* (2009) Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nat Nanotechnol* 4(2): 126–133.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.374>
38. *Yang Z, Zhang Y, Yang Y, Sun L, Han D, Li H, Wang C* (2010) Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. *Nanomedicine* 6(3): 427–441.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.11.007>
39. *Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y* (2007) DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Lett* 7(12): 3592–3597.  
<https://doi.org/10.1021/nl071303v>
40. *Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML* (2014) Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv Healthc Mater* 3(3): 424–432.  
<https://doi.org/10.1002/adhm.201300178>
41. *Aragon MJ, Topper L, Tyler CR, Sanchez B, Zychowski K, Young T, Herbert G, Hall P, Erdely A, Eye T, Bishop L, Saunders SA, Muldoon PP, Ottens AK, Campen MJ* (2017) Serum-borne bioactivity caused by pulmonary multiwalled carbon nanotubes induces neuroinflammation via blood-brain barrier impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(10): E1968–E1976.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1616070114>
42. *Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Aschberger K, Stone V* (2010) A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology* 4(2): 207–246.  
<https://doi.org/10.3109/17435390903569639>
43. *Jiang T, Amadei CA, Gou N, Lin Y, Lan J, Vecitis CD, Gu AZ* (2020) Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs): Effect of Lengths, Functional Groups and Electronic Structures Revealed by a Quantitative Toxicogenomics Assay. *Environ Sci Nano* 7(5): 1348–1364.  
<https://doi.org/10.1039/d0en00230e>
44. *Lee S, Khang D, Kim SH* (2015) High dispersity of carbon nanotubes diminishes immunotoxicity in spleen. *Int J Nanomed* 10(1): 2697–2710.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S80836>
45. *Zhang M, Yamaguchi T, Iijima S, Yudasaka M* (2013) Size-dependent biodistribution of carbon nanohorns in vivo. *Nanomedicine* 9(5): 657–664.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.011>
46. *Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G* (2006) Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 6(7): 1522–1528.  
<https://doi.org/10.1021/nl061160x>
47. *Lu F, Gu L, Meziani MJ, Wang X, Luo PG, Veca LM, Cao L, Sun Y-P* (2009) Advances in Bio-applications of Carbon Nanotubes. *Adv Mater* 21(2): 139–152.  
<https://doi.org/10.1002/adma.200801491>



### Behavior of Rats in Tests for Anxiety after a Short Intranasal Injection of Single-Walled Carbon Nanotubes in Two Small Doses

E. V. Loseva<sup>a, \*</sup>, N. A. Loginova<sup>a</sup>, L. I. Russu<sup>b</sup>, and M. V. Mezentseva<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*Ivanovskii Institute of Virusology, Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

\**e-mail: losvnd@mail.ru*

Carbon nanotubes (CNTs) are very promising for use in various areas of human activity, including medicine, but they can have a negative effect on the body, in particular on the nervous system. CNTs in large doses in animal experiments often cause anxiety and depressive disorders. The effect of low doses of CNTs on the behavior of animals has been little studied. In the present work, we studied behavioral parameters in tests for anxiety in rats, which were intranasally injected daily for 4 days with a suspension of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) in small doses, 5.2 or 52  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . It turned out that both doses of SWCNTs unidirectionally changed the following indicators of behavior in rats: in the open field test exploratory activity (rears) decreased; in the light-dark test the latency of entering to the dark box and peeping out of the dark box are increased; in the elevated plus maze test (EPM) behavior in the open arm was activated. However, if a dose of 5.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  induced the rat behavior with signs of agitation (increased exploratory motor activity in the light-dark and EPM tests, and motor activity with frequent visits to different boxes or arms and exploratory activity in the light-dark and EPM tests), then a dose of 52  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , on the contrary, inhibited a number of behavioral responses, which was expressed in increased anxiety (increased the freezing in the open field and EPM) and in increased the latency of entry into the closed arm of the EPM. It is assumed that SWCNTs in small doses, when injected intranasally into the brain of rats, can dose-dependently disrupt the structural and functional state of nervous tissue cells and/or cause neuroinflammation in the structures involved in the mechanisms of anxiety and related conditions, as a result, the behavior of rats in tests for anxiety also changes in a dose-dependent manner.

**Keywords:** single-walled carbon nanotubes, small doses, intranasal injection, rat behavior, open field test, light-dark test, elevated plus maze test