

DOI: <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2020-60-11-749-752>

УДК 616-073.754.3-032.3-026.88:616.8-009

© Габидинова Г.Ф., 2020

Габидинова Г.Ф.

Эффекты многостенных углеродных нанотрубок при интратрахеальном введении в дозах, соответствующих реальным производственным экспозициям, на состояние нервной системы экспериментальных животных

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, ул. Бутлерова, 49, Казань, Россия, 420012

Введение. В связи с расширением объемов производства и сфер применения многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) необходима всесторонняя токсикологическая оценка наноматериала с последующей разработкой подходов к регулированию их содержания в различных объектах для снижения рисков неблагоприятных воздействий на здоровье человека.

Цель исследования — оценка состояния нервной системы экспериментальных животных в ответ на интрафарингеальное введение МУНТ в дозах, соответствующих реальным производственным экспозициям.

Материалы и методы. Объектом исследования стали двухмесячные мыши линии C57BL. Опытные группы получили путем фарингеальной аспирации 20 мкг МУНТ в 0,1% растворе Твин 80; контрольной группе тем же способом был введен 0,1% Твин 80. Оценка состояния нервной системы проводилась через 24 часа и 30 дней после экспозиции в батарее поведенческих тестов.

Результаты. Использование метода «Открытое поле» позволило установить признаки повышенной тревожности и ослабления ориентировочно-исследовательских реакций у опытной группы через 24 часа после экспозиции. Через 30 дней у опытной группы по сравнению с контрольной обнаружился повышенный уровень тревожности в переменных стрессогенных условиях.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования выявили некоторые поведенческие отклонения у опытной группы по сравнению с контрольной через 24 часа и 30 дней после экспозиции, что позволяет предположить наличие общей системной или стресс-реакции на введение суспензии МУНТ.

Ключевые слова: многостенные углеродные нанотрубки; поведенческие тесты; производственная экспозиция; нейротоксичность

Для цитирования: Габидинова Г.Ф. Эффекты многостенных углеродных нанотрубок при интратрахеальном введении в дозах, соответствующих реальным производственным экспозициям, на состояние нервной системы экспериментальных животных. *Мед. труда и пром. экол.* 2020; 60(11): 749–752. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2020-60-11-749-752>

Для корреспонденции: Габидинова Гульназ Фаезовна, аспирант каф. гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет». E-mail: gabidinova26@yandex.ru

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

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Дата поступления: 02.09.2020 / Дата принятия к печати: 19.10.2020 / Дата публикации: 03.12.2020

Gulnaz F. Gabidinova

Effects of multi-walled carbon nanotubes on the state of the nervous system of experimental animals during intratracheal administration in doses corresponding to real production exposures

Kazan State Medical University, 49, Butlerova str., Kazan, Russia, 420012

Introduction. Due to the expansion of production volumes and applications of multi-wall carbon nanotubes (MWCN), a comprehensive toxicological assessment of the nanomaterial is required, followed by the development of approaches to regulating their content in various facilities to reduce the risks of adverse effects on human health.

The aim of the study was to assess the state of the nervous system of experimental animals in response to intrapharyngeal introduction of MWCN in doses corresponding to real production exposures.

Materials and methods. The object of the study was two-month-old C57BL mice. The experimental groups received by pharyngeal aspiration 20 mcg of MWCN in 0.1% solution of Twin 80; the control group was administered 0.1% Twin 80 in the same way. The nervous system was evaluated 24 hours and 30 days after exposure in a battery of behavioral tests.

Results. The use of the "Open field" method allowed us to establish signs of increased anxiety and weakening of research responses in the experimental group 24 hours after exposure. After 30 days, the experimental group showed an increased level of anxiety in variable stress conditions compared to the control group.

Conclusions. Thus, the conducted studies revealed some behavioral deviations in the experimental group compared to the control group 24 hours and 30 days after exposure, which suggests the presence of a General systemic or stress reaction to the introduction of the MWCN suspension.

Keywords: multi-wall carbon nanotubes (MWCN); behavioral tests; industrial exposure; neurotoxicity

For citation: Gabidinova G.F. Effects of multi-walled carbon nanotubes on the state of the nervous system of experimental animals during intratracheal administration in doses corresponding to real production exposures. *Med. truda i prom. ekol.* 2020; 60(11): 749–752. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2020-60-11-749-752>

For correspondence: Gulnaz F. Gabidinova, postgraduate student of the Department of hygiene and occupational health, Kazan State Medical University. E-mail: gabidinova26@yandex.ru

Information about author: Gabidinova G.F. <https://orcid.org/0000-0003-2616-5017>

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-32-20197, partial funding

— grant No. 19-315-90046).

Conflict of interests. The author declares no conflict of interests.

Received: 02.09.2020 / Accepted: 19.10.2020 / Published: 03.12.2020

Введение. Углеродные нанотрубки (УНТ), обладающие уникальными физико-химическими характеристиками, относятся к одним из наиболее популярных типов наноматериалов на сегодняшний день. В зависимости от количества структурообразующих слоев, их подразделяют на одностенные и многостенные углеродные нанотрубки.

Спектр возможного применения многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) включает в себя области электроники, машиностроения, строительную отрасль, химическую промышленность, сельское хозяйство, медицину, освоение космоса. В последние годы происходит расширение объемов производства и областей применения МУНТ, что увеличивает потенциальный риск возможных неблагоприятных воздействий на здоровье человека.

Наиболее распространенным путем поступления МУНТ в организм человека в ходе производственного процесса считается ингаляционный путь. Существует большое количество исследований ингаляционной токсичности МУНТ с использованием моделей *in vivo*, в которых показано наличие легочной, сердечно-сосудистой токсичности, нейротоксичности, наряду с депрессией и тревогой. Определение показателей, характеризующих состояние поведенческих функций, позволяет оценить общетоксическое и нейротоксическое действие исследуемого наноматериала на экспериментальных животных.

Влияние МУНТ на состояние нервной системы крыс линии Вистар изучалось при ежедневном пероральном поступлении МУНТ «Таунит-М» в дозах от 0,01 до 10 мг/кг массы тела в течение 100 дней [1]. Изменения когни-

тивных функций в тесте «Условный рефлекс пассивного избегания» выявлено не было, что может быть связано с возможной агломерацией нанотрубок в агрессивных средах желудка и кишечника и снижением вероятности их попадания в кровь.

В другой работе изучалось влияние перорального введения более высоких доз МУНТ «Таунит» на состояние нервной системы лабораторных мышей при экспозиции в течение 14 суток [2]. У животных наблюдалось увеличение спонтанной двигательной активности, количества локомоций и снижение порога эмоциональных реакций.

Изучение ингаляционной токсичности МУНТ наиболее актуально в связи со способностью углеродных нанотрубок к образованию аэрозолей на различных стадиях производственного цикла.

Цель исследования — оценка состояния нервной системы экспериментальных животных в ответ на интратрахеальное введение дозы МУНТ, соответствующей сценарию реальной производственной экспозиции.

Материалы и методы. Для эксперимента были выбраны двухмесячные мыши линии C57BL, самцы, масса тела 18 ± 2 грамма. Животные были разделены на контрольную и опытную группы по 20 мышей в каждой. Опытные группы получили путем фарингеальной аспирации 20 мкг МУНТ в 0,1% растворе Твин 80; контрольной группе тем же способом был введен 0,1% Твин 80.

В работе исследовали влияние МУНТ «Таунит-М», полученных непосредственно на предприятии по их производству в г. Тамбов, Россия. В соответствии с характе-

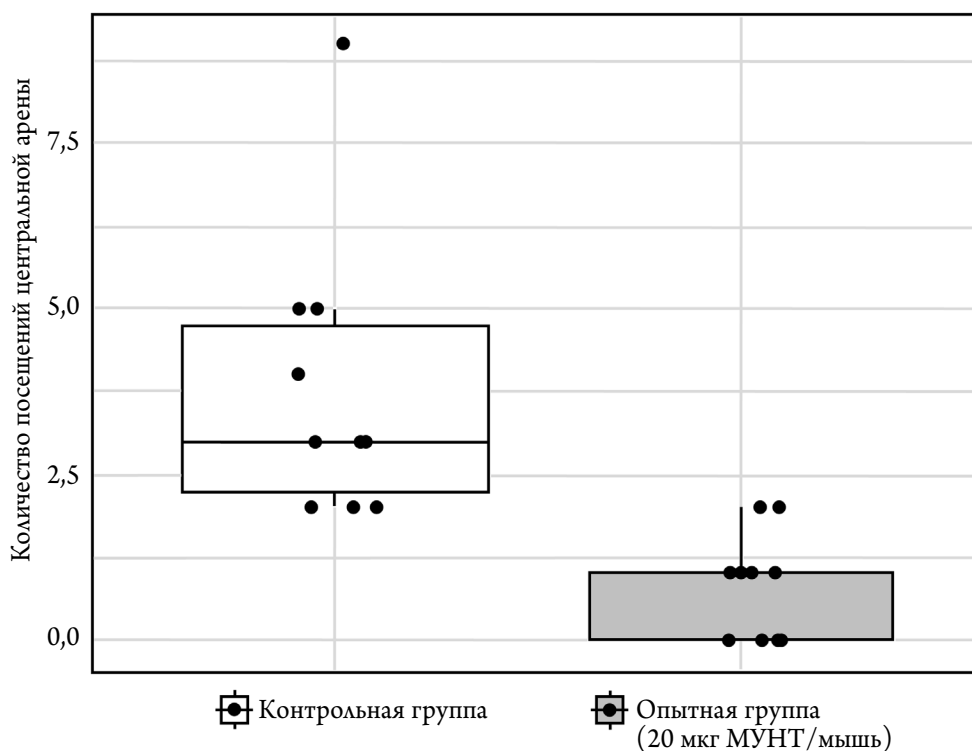


Рисунок. Горизонтальная двигательная активность в центре арены в тесте «Открытое поле» через 24 часа после интрафарингеальной аспирации ($p < 0,001$)
Figure. Horizontal locomotor activity in the center of the arena in the "Open Field" test 24 hours after intrapharyngeal aspiration ($p < 0,001$)

Таблица / Table

Результаты поведенческих тестов у мышей линии C57BL/6 через 24 часа после однократного интрафарингеального и внутривенного введения МУНТ (медиана [25%;75%])**Results of behavioral tests in C57BL/6 mice 24 hours after a single intrapharyngeal and intravenous administration of MWCN (median [25%;75%])**

Группа	«Открытое поле»			
	Количество пересеченных линий	Количество посещений центральной арены	Количество обследованных отверстий	Уровень дефекации (количество болюсов)
24 часа после экспозиции				
Контрольная	73,00 [52,75;85,25]	3,00 [2,25;4,75] *	15,50 [9,50;19,25]*	0,00 [0,00;0,00]*
Опытная (20 мкг МУНТ/мышь)	59,50 [36,50;72,25]	1,00 [0,00;1,00] *	10,00 [6,25;12,50]*	0,50 [0,00;1,00]*
<i>p</i>	0,13	0,0003*	0,059*	0,054*
30 дней после экспозиции				
Контрольная	57,00 [37,50;74,75]	2,00 [0,00;5,75]	13,00 [9,25;16,50]	0,00 [0,00;1,50]
Опытная (20 мкг МУНТ/мышь)	63,50 [47,50;71,50]	2,00 [1,00;3,00]	14,00 [11,00;17,00]	0,00 [0,00;0,00]
<i>p</i>	0,88	0,91	0,65	0,55
Группа	«Вращающийся стержень»	«Крестообразный лабиринт»		
	Время удержания на стержне (сек)	Время, проведенное в открытых рукавах (сек)	Время, проведенное в закрытых рукавах (сек)	Средняя скорость движения (см/сек)
24 часа после экспозиции				
Контрольная	120,00 [100,00;120,00]	4,80 [1,40;28,82]	242,74 [165,95;258,87]	3,77 [3,19;4,43]
Опытная (20 мкг МУНТ/мышь)	120,00 [120,00;120,00]	2,80 [0,12;13,50]	235,25 [197,95;253,42]	2,97 [2,68;3,73]
<i>p</i>	0,61	0,43	0,85	0,105
30 дней после экспозиции				
Контрольная	14,00 [4,50;28,25]	0,00 [0,00;1,60]	202,85 [155,42;229,22]*	2,72 [2,23;2,86]
Опытная (20 мкг МУНТ/мышь)	14,50 [7,50;32,75]	0,25 [0,00;1,57]	257,19 [243,45;267,35]*	2,42 [2,25;2,71]
<i>p</i>	0,91	0,69	0,052*	0,630

Примечание: * достоверное отличие от контрольной группы, расчеты проводились с использованием критерия Манна–Уитни; жирным курсивом выделены результаты при $p < 0.1$

Note: * significant difference from the control group, calculations were performed using the Mann–Whitney test; results are shown in bold italics at $p < 0.1$

ристикой производителя МУНТ «Таунит-М» имеет диаметр в диапазоне 10–30 нм, длину >2 мкм.

Затравочные дозы подбирались соответственно данным оценки содержания МУНТ в воздухе на рабочих местах предприятия-производителя с использованием модели MPPD [3].

Оценка состояния нервной системы и поведенческих функций проводилась через 24 часа и 30 дней после экспозиции. В каждом опыте наблюдались по 10 мышей из контрольной и опытной групп.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Для изучения эффектов МУНТ на нервную систему был проведен ряд поведенческих тестов для каждого животного, включающий методы «Открытое поле», «Вращающийся стержень», «Крестообразный лабиринт».

При проведении теста «Открытое поле» была исполь-

зована установка «Открытое поле для мышей» без разметки (НПК Открытая Наука, Россия). Методика «Открытое поле» позволяет изучить поведение лабораторных животных в новых стрессогенных условиях и оценить эмоционально-поведенческую реактивность, исследовательское поведение, симптомы неврологического дефицита грызунов. Показатели регистрировались в течение трех минут нахождения животного в установке.

Для регистрации поведения животных в условиях переменной стрессогенности использовали установку «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК Открытая наука, Россия). Автоматическую регистрацию проводили при помощи специального программного обеспечения для видеотрекинга *Etho Vision* (фирма *Noldus*).

Методика «Вращающийся стержень» (НПК Открытая наука, Россия) позволила объективно оценить наличие мышечной релаксации, нарушения равновесия и координации движений. Скорость вращения стержня составля-

ла 15 оборотов в минуту. Удержание мышей на стержне в течение двух минут считалось максимальным.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета R. При сравнении опытной и контрольной групп в каждом эксперименте применяли критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Использование метода «Открытое поле» через 24 часа после интрафарингеального введения МУНТ позволило установить признаки повышенной тревожности у опытной группы, что проявлялось в уменьшении двигательной активности в центре арены, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) (рисунок). Кроме этого, мыши опытной группы демонстрировали ослабленные ориентировочно-исследовательские реакции по сравнению с контрольной группой, что проявлялось в меньшем количестве обследованных норок ($p = 0,059$). Повышенный уровень дефекации у мышей, получивших дозу МУНТ, свидетельствует о возросшем уровне тревожности ($p = 0,055$).

Оценка состояния поисковой и исследовательской активности, скорости принятия решений методом «Крестообразный лабиринт» не выявила статистически значимых различий между контрольными и опытными группами че-

рез 24 часа после экспозиции. Однако через 30 дней после введения МУНТ у опытной группы был зарегистрирован высокий уровень тревожности в незнакомой ситуации: общее время, проведенное в закрытых рукавах, у опытной группы было выше, чем у контрольной ($p = 0,052$).

В тесте «Вращающийся стержень» мыши опытной группы не демонстрировали нарушения равновесия и координации движения по сравнению с контрольной группой через 24 часа и 30 дней после интрафарингеальной экспозиции.

Результаты поведенческих тестов через 24 часа и 30 дней после экспозиции приведены в *таблице*.

Заключение. Проведённые исследования выявили поведенческие отклонения у опытной группы по сравнению с контрольной через 24 часа после экспозиции, что позволяет предположить наличие общей системной или стресс-реакции на введение суспензии МУНТ. Через 30 дней после экспозиции различия между опытной и контрольной группами стали менее выраженными. Полученные результаты можно объяснить проникновением МУНТ через естественные барьеры организма и прямым влиянием на нервную систему либо общей реакцией лабораторных животных на раздражение дыхательных путей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шипелин В.А., Шумакова А.А., Масютин А.Г. и др. Оценка *in vivo* подострой пероральной токсичности многостенных углеродных нанотрубок. Характеристика наноматериала и интегральные показатели. *Российские нанотехнологии*. 2017; 12(9–10).
2. Горшенева Е.Б., Топчиева З.С. Влияние углеродного наноматериала (УНМ) «Таунит» на поведенческие реакции лабораторных мышей. *Вестник российских университетов*. 2017; 22(2).
3. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р., Кисин Е.Р., Шведова А.А. Характеристика производственных экспозиций и медико-биологических эффектов многостенных углеродных нанотрубок: обзор серии собственных исследований. *Токсикологический вестник*. 2016; 6: 42–7.

REFERENCES

1. Shipelin V.A., Shumakova A.A., Masjutin A.G. et al. In vivo evaluation of subacute oral toxicity of multi-walled carbon nanotubes. Characteristics of the nanomaterial and integral indicators. *Rossiiskie nanotekhnologii*. 2017; 12 (9–10) (in Russian).
2. Gorsheneva E.B., Topchieva Z.S. Influence of carbon nanomaterial (CNM) "Taunit" on behavioral responses of laboratory mice. *Vestnik rossijskih universitetov*. 2017; 22(2) (in Russian).
3. Fatkhutdinova L.M., Haliullin T.O., Zalzajlov R.R., Kisin E.R., Shvedova A.A. Characterization of industrial expositions and biomedical effects of multi-walled carbon nanotubes: a review of a series of our own studies. *Toksikologicheskij vestnik*. 2016; 6: 42–7 (in Russian).