

Шипелин В.А.<sup>1</sup>, Ригер Н.А.<sup>1</sup>, Трушина Э.Н.<sup>1</sup>, Мустафина О.К.<sup>1</sup>, Маркова Ю.М.<sup>1</sup>, Полянина А.С.<sup>1</sup>, Масютин А.Г.<sup>2</sup>, Чернов А.И.<sup>3</sup>, Гмошинский И.В.<sup>1</sup>, Хотимченко С.А.<sup>1,4</sup>

## ВЛИЯНИЕ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС ВИСТАР ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

<sup>1</sup>ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» РАН, 119991, Москва;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва

**Введение.** Одностенные углеродные нанотрубки (ОСУНТ) могут создавать риски для здоровья человека при поступлении в организм пероральным путём в случае использования их в упаковочных материалах, в качестве перспективных агрохимикатов и пестицидов. Цель работы – оценка подострой пероральной токсичности ОСУНТ для крыс.

**Материал и методы.** В 92-дневном эксперименте ОСУНТ вводили крысам вместе с питьевой водой в дозах 0 (контроль); 0,01; 0,1; 1,0 и 10 мг/кг массы тела (м.т.) в группах с первой по пятую, соответственно. Изучали гематологические показатели крови, апоптоз гепатоцитов, уровни про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови и их продукцию клетками селезёнки *ex vivo*, содержание основных и транзиторных компонентов кишечного микробиоценоза слепой кишки.

**Результаты.** При дозе ОСУНТ 0,01 мг/кг м.т. отмечалось снижение количества нейтрофилов и базофилов, повышение численности лимфоцитов, снижение числа и объёма тромбоцитов. При дозе 0,1 мг/кг м.т. выявлено снижение числа клеток на ранней стадии апоптоза и общего числа клеток в апоптозе, а также отмечено достоверное снижение уровней цитокинов IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, хемокина MIP-3a, изоформы 1 TGF- $\beta$ ; при дозе 1,0 мг/кг цитокина IL-12p70 кД и изоформ 1 и 3 TGF- $\beta$ . Уровень TGF- $\beta$ 2 был достоверно повышен в группе 5. Отмечалось подавляющее действие ОСУНТ на содержание плесневой флоры кишечника при всех дозах наряду с возрастанием содержания дрожжей при дозе 1 мг/кг м.т. В 28-дневном эксперименте иммунизация крыс овальбумином оказала определённое модулирующее действие на иммунотропные эффекты ОСУНТ, вводимых в дозе 0,1 мг/кг м.т.

**Заключение.** ОСУНТ проявляют ряд эффектов в отношении изученных показателей, не демонстрирующие монотонной зависимости от дозы наноматериала, что, по-видимому, связано с процессами агрегации ОСУНТ.

Ключевые слова: одностенные углеродные нанотрубки; крысы; пероральная токсичность; апоптоз; цитокины; микробиом кишечника.

**Для цитирования:** Шипелин В.А., Ригер Н.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Маркова Ю.М., Полянина А.С., Масютин А.Г., Чернов А.И., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Влияние одностенных углеродных нанотрубок на иммунологические, гематологические и микробиологические показатели крыс Вистар при пероральном введении. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(11): 1114-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1114-21>

**Для корреспонденции:** Гмошинский Иван Всеволодович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». E-mail: [gmosh@ion.ru](mailto:gmosh@ion.ru)

Shipelin V.A.<sup>1</sup>, Riger N.A.<sup>1</sup>, Trushina E.N.<sup>1</sup>, Mustafina O.K.<sup>1</sup>, Markova Yu.M.<sup>1</sup>, Polyagina A.S.<sup>1</sup>, Masyutin A.G.<sup>2</sup>, Chernov A.I.<sup>3</sup>, Gmoshinsky I.V.<sup>1</sup>, Khotimchenko S.A.<sup>1,4</sup>

## INGESTED SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES AFFECT ON IMMUNOLOGICAL, HEMATOLOGICAL AND MICROECOLOGICAL INDICES OF WISTAR RATS

<sup>1</sup>Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, 109240, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup>A.M. Prokhorov General Physics Institute, Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>4</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation

**Introduction.** Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) can create risks to human health when they enter the body by oral route when used in packaging materials, as promising agrochemicals and pesticides.

**The aim of the study.** Evaluation of the subacute oral toxicity of SWCNT in rats.

**Material and methods.** In the 92-days of the experiment, the SWCNTs were administered to rats along with drinking water at doses of 0 (control); 0.01; 0.1; 1.0 and 10 mg/kg body weight (BW) in the groups 1-5, respectively. Hematological indices of blood, apoptosis of hepatocytes, levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in blood plasma and their production by cells of the spleen *ex vivo*, the content of the main and transient components of the intestinal microbiocenosis in the cecum were studied. There were determined hematological blood counts, hepatocyte apoptosis, levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in blood plasma and their production by spleen cells *ex vivo*, content in the cecum of the main and transient components of the intestinal microbiocenosis.

**Results.** At the SWCNT dose of 0.01 mg/kg BW there was a decrease in the number of neutrophils and basophils, an increase in the number of lymphocytes, and a decrease in the number and volume of platelets. At a dose of 0.1 mg/kg bw there was noted a decrease in the number of cells in the early stage of apoptosis and the total number of cells in apoptosis, as well as a significant decrease in the levels of cytokines IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, chemokine MIP-3a, TGF- $\beta$  isoform 1; at a dose of 1.0 mg/kg IL-12p70, and TGF- $\beta$  isoforms 1 and 3. TGF- $\beta$ 2 level was significantly

elevated in group 5. The suppressive effect was noted for SWCNTs on the mold flora in intestinal contents at all doses of nanomaterial used, whereas the number of yeasts increased at 1 mg/kg BW. The immunization of rats with ovalbumin had a clear modulating effect on the immunotropic effects of SWCNTs administered at a dose of 0.1 mg/kg BW in a 28-days experiment.

**Discussion.** The mechanisms of the observed changes development are likely to be associated with both systemic anti-inflammatory effects and with a decrease in the effect of SWCNT on the permeability of the intestinal barrier to protein antigens and microbial toxins.

**Conclusion.** SWCNTs exhibit a number of effects in relation to the studied indices that do not demonstrate a monotonic dependence on the dose of nanomaterial, which, apparently, is related to the processes of aggregation of the SWCNT.

**Key words:** single-walled carbon nanotubes; rats; oral toxicity; apoptosis; cytokines; intestinal microbiome.

**For citation:** Shipelin V.A., Riger N.A., Trushina E.N., Mustafina O.K., Markova Yu.M., Polyana A.S., Masyutin A.G., Chernov A.I., Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A. Ingested single-walled carbon nanotubes affect on immunological, hematological and microecological indices of Wistar rats. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(11): 1114-21. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1114-21>

**For correspondence:** Ivan V. Gmshinsky, MD, Ph.D. DSci., a leading researcher of the Department of Food Toxicology and Evaluation of Nanotechnology Safety of the Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: [gmosh@ion.ru](mailto:gmosh@ion.ru).

**Information about authors:** Shipelin V.A., <http://orcid.org/0000-0002-0015-8735>;

Riger N.A., <http://orcid.org/0000-0001-7149-2485>; Trushina E.N., <http://orcid.org/0000-0002-0035-3629>;

Mustafina O.K., <http://orcid.org/0000-0001-7231-9377>; Markova Yu.M., <http://orcid.org/0000-0002-2631-6412>;

Polyana A.S., <http://orcid.org/0000-0002-2766-7716>; Chernov A.I., <http://orcid.org/0000-0002-6492-9068>;

Gmshinsky I.V., <http://orcid.org/0000-0002-3671-6508>; Khotimchenko S.A., <http://orcid.org/0000-0002-5340-9649>.

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

**Acknowledgment.** The work was carried out at the expense of subsidies for the implementation of the state task in the framework of the Program of Fundamental Scientific Research (topic of the Federal Agency for Interventions in the Russian Federation No. 0529-2014-0045).

Received: 10 May 2018

Accepted: 18 October 2018

## Введение

В настоящее время производство предприятиями нанотехнологии одностенных углеродных нанотрубок (ОСУНТ) приобретает массовый характер. Выпускаемые в виде порошков ОСУНТ содержат агломераты и спутанные клубки (тяжи) индивидуальных нанотрубок и применяются при изготовлении токопроводящих покрытий в электронной технике, в композитных материалах для авиации и автомобилестроения [1]. В фармацевтической промышленности предполагается использование углеродных нанотрубок в роли носителей лекарственных препаратов [2, 3], в сельском хозяйстве – в качестве компонентов пестицидов, стимуляторов роста растений и средств регуляции численности грызунов-вредителей [4, 5]. Вместе с тем контакт человека с углеродными нанотрубками, в частности с ОСУНТ, может явиться источником потенциальных рисков в связи с наличием у них обштоксического [6, 7] и иммунотоксического действия [8, 9], предположительно опосредуемого эффектами так называемого «незавершённого фагоцитоза» [7]. Такие эффекты ОСУНТ, как развитие воспаления, гранулём и фиброза ткани лёгких и печени, охарактеризованы почти исключительно при парентеральном [11, 12] и ингаляционном [6] поступлении в организм лабораторных животных. Однако всесторонняя оценка риска ОСУНТ требует учёта и других сценариев их поступления в организм, в том числе пероральным путём. Сведения об эффектах ОСУНТ при поступлении в желудочно-кишечный тракт в литературе немногочисленны. Так, в исследовании [8] ОСУНТ длиной более 1 мкм при пероральном введении мышам в очень высокой дозе (1000 мг/кг м.т.) не продемонстрировали никаких признаков токсичности. Но по аналогии с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) [13, 14] можно предположить, что большинство эффектов ОСУНТ парадоксальным образом проявляются при их малых и сверхмалых дозах. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение в подостром эксперименте гематологических, иммунологических показателей организма, апоптоза клеток печени и состояния микробиоты кишечника у лабораторных крыс, получающих ОСУНТ с питьевой водой в широком интервале доз.

## Материал и методы

В работе был исследован препарат ОСУНТ производства фирмы ООО «Углерод-ЧГ» (г. Черноголовка Московской области), состоящий более чем на 90% из ОСУНТ с примесью двустенных нанотрубок и аморфного углерода. Для получения его

стабильных водных дисперсий использовали метод, апробированный ранее на препарате МУНТ [15], и состоящий в обработке ультразвуком в растворе 1% по объёму поверхностно-активного вещества «Tween-20» (далее – «носитель»). В результате ультразвукового диспергирования в водном растворе носителя ОСУНТ в максимальной концентрации 100 мг/см<sup>3</sup> давали интенсивно окрашенный однородный коллоидный раствор, стабильный в течение не менее одних суток. Анализ по методу динамического рассеяния света показал (см. рисунок, а, на 3-й стр. обложки), что в водной дисперсии наблюдается бимодальное распределение по размерам агрегатов (клубков) ОСУНТ со средними гидродинамическими диаметрами 161 нм (98% по числу частиц) и 1100 нм (2%). По данным трансмиссионной электронной микроскопии (см. рисунок, б, на 3-й стр. обложки) препарат был представлен индивидуальными волоконистыми объектами диаметром около 5 нм и длиной более 1000 нм и некоторого количества сферических частиц диаметром 5–10 нм, предположительно аморфного углерода. На электронной дифрактограмме образца (см. рисунок, в, на 3-й стр. обложки) присутствовали непрерывные концентрические кольца, характерные для поликристаллической углеродной структуры. В спектрах комбинационного рассеяния света от материала, использованного для приготовления суспензий, была представлена спектральная компонента при 1589 см<sup>-1</sup>, относящаяся к продольным колебаниям атомов углерода для одностенных нанотрубок, и компонента в области «дыхательных» мод (100–250 см<sup>-1</sup>), отвечающая радиальным колебаниям атома углерода одностенной нанотрубки. В совокупности полученные данные позволяют охарактеризовать изученные образцы как одностенные углеродные нанотрубки.

Исследования на животных выполняли в соответствии с Российскими и международными требованиями надлежащей лабораторной практики\*. Использовали крыс самцов линии Вистар исходной средней массой тела (м.т.) 80 г, полученных из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Животные получали сухой сбалансированный корм производства фирмы

\* Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press. 2011.

## Показатели апоптоза гепатоцитов крыс групп 1–5 на 92-е сутки эксперимента

Группа	Число крыс, <i>n</i>	Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.	Живые клетки AnV-FITC(-) 7-AAD(-)	«Ранний» апоптоз AnV-FITC(+) 7-AAD(-)	«Поздний» апоптоз AnV-FITC(+) 7-AAD(+)	Сумма клеток в апоптозе	Мёртвые клетки AnV-FITC(-) 7-AAD(+)
1	6	0	95,6 ± 0,4	4,20 ± 0,39	0,133 ± 0,042	4,33 ± 0,41	0,08 ± 0,02
2	5	0,01	96,0 ± 0,4	3,66 ± 0,39	0,120 ± 0,020	3,78 ± 0,38	0,18 ± 0,04*
3	6	0,1	96,9 ± 0,3*	2,83 ± 0,33*	0,067 ± 0,021	2,90 ± 0,33*	0,18 ± 0,06
4	6	1,0	96,3 ± 0,2	4,08 ± 0,55	0,133 ± 0,033	4,15 ± 0,55	0,17 ± 0,02*
5	6	10	95,3 ± 0,4	4,42 ± 0,34	0,183 ± 0,048	4,60 ± 0,34	0,10 ± 0,04

Примечание. \* – различие с группой 1 (контроль) достоверно,  $p < 0,05$ , *t*-тест Стьюдента и/или критерий Манна–Уитни.

ООО «Лабораторкорм» (Россия) в режиме неограниченного доступа. Крыс размещали по 2 особи в клетках из поликарбоната при 12/12 часовом режиме освещённости и температуре  $21 \pm 1$  °C. В первом эксперименте 80 крыс были разделены методом случайной выборки на 5 групп по 16 особей; исходная м.т. в группах не различалась ( $p > 0,1$  ANOVA). В течение 92 суток животные получали с питьевой водой носитель (первая, контрольная группа) или дисперсии ОСУНТ в разведениях на растворе носителя согласно [15]. Дозы ОСУНТ, определённые на основе ежедневных замеров количества потребляемой животными жидкости, составили в опытных группах (со второй по пятую), 0,01; 0,1; 1,0 и 10 мг/кг м.т. соответственно. Доза носителя во всех группах, включая контрольную, составляла в среднем 2 г/кг м.т. в сутки. Выведение животных из эксперимента осуществляли на 92-е сутки после 16-часового голодания путём обескровливания из нижней полой вены под глубокой эфирной анестезией. В асептических условиях стерильными инструментами отбирали кровь, ткань печени, селезенки и содержимое слепой кишки.

Во втором эксперименте, проведённом в соответствии с МУ 1.2.0052–11 «Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета», 4 группы крыс (по 10 крыс в каждой) получали в течение 28 суток с питьевой водой раствор носителя (группы 1а и 3а) или дисперсию ОСУНТ в дозе 0,1 мг/кг м.т. (группы 2а и 4а). При этом на 1-е, 3-и, 5-е и 22-е сутки крыс групп 2а и 4а внутрибрюшинно иммунизировали овалбумином куриного яйца (ОВА), адсорбированным на гидроксиде алюминия. Животных выводили из эксперимента на 29-е сутки с отбором крови для определения иммунологических и гематологических показателей.

Гематологические показатели определяли в цельной крови стандартными методами на гематологическом анализаторе «Coulter AC TTM 5 diff OV» (Beckman Coulter, США) с набором реагентов (Beckman Coulter, Франция). Апоптоз клеток печени изучали на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter International S.A., Австрия) с использованием технологии окрашивания гепатоцитов в суспензии флуоресцентными реагентами FITC-аннексином V и 7-аминоактиномицином (7-AAD) [16]. Для определения уровней цитокинов и ростовых факторов (GM-CSF, GRO/KC, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, INF-g, MCP-1, M-CSF, MIP-

1a, MIP-3a, RANTES, TNF-a, VEGF, TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3) в сыворотке крови использовали коммерческий набор для мультиплексного иммуноанализа Bio-Plex Pro Rat Cytokine Grp 1 Panel 24-Plex производства фирмы Bio-Rad Laboratories, Inc. (США). Концентрации перечисленных факторов определяли одновременно в одной пробе сыворотки с использованием технологии Luminex на основе магнитных микросфер Bio-Plex Pro. Измерения выполняли на лазерном мультиплексном проточном анализаторе Luminex 200 (производства фирмы Luminex Corporation, США). Продукцию цитокинов и хемокинов культивируемыми *ex vivo* клетками селезенки животных оценивали согласно [17]. Методика соответствовала МУ 1.2.2635-10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

Для оценки состояния микробиоты кишечника делали ряд десятикратных разведений проб содержимого слепой кишки в фосфатно-тиогликолевом буфере и количественно засевали в дифференциально-диагностические и селективные среды. Содержание бифидобактерий определяли на среде ГМК, лактобацилл – на MRS агаре, энтеробактерий – на среде Эндо, цитратассимилирующих энтеробактерий – на цитратном агаре Симмонса, *Staphylococcus spp.* – на агаре Байрд – Паркера, *Enterococcus spp.* – на азидном агаре с канамицином и эскулином; *Bacteroides spp.* – на желчно-эскулиновом агаре для бактероидов, дрожжей и плесневых грибов – на среде Сабуро со стрептомицином. Инкубирование анаэробных микроорганизмов осуществляли с использованием газогенерирующих пакетов для химического связывания кислорода AnaeroGen™ (Oxoid, Япония). Количество микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г сырой массы содержимого слепой кишки. Оценку антагонистической (кислотообразующей) активности бифидобактерий проводили путём определения pH культуральной жидкости среды выращивания на 5-е сутки инкубации с помощью pH-метра. Методика эксперимента соответствовала МУ 1.2.2634–10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS 18.0. Расчёт включал определение выборочно-среднего, стандартной ошибки, вероятности принятия нулевой гипотезы о совпадении распределений сравниваемых выборок согласно критерию Стьюдента, Манна – Уитни и ANOVA. Различия признавали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Таблица 2

## Гематологические показатели\* (лейкоциты, тромбоциты) крови крыс групп 1-5\*\* на 92-е сутки эксперимента

Группа	Число крыс, <i>n</i>	Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.	Нейтрофилы, %	Базофилы, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Тромбоциты, $10^9$ дм <sup>-3</sup>	Средний объем тромбоцита, мкм <sup>-3</sup>
1	9	0	30,2 ± 2,8 <sup>2**</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>2</sup>	58,2 ± 2,7 <sup>2</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>4</sup>	601 ± 22	6,21 ± 0,08 <sup>2</sup>
2	10	0,01	20,4 ± 1,2 <sup>1</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>1</sup>	67,1 ± 1,9 <sup>1</sup>	8,9 ± 0,3	597 ± 15	5,91 ± 0,10 <sup>1</sup>
3	10	0,1	23,3 ± 2,2	0,13 ± 0,02	65,4 ± 2,5	9,4 ± 0,5	587 ± 30	6,14 ± 0,15
4	10	1,0	25,1 ± 2,4	0,15 ± 0,02	65,1 ± 2,4	7,9 ± 0,5 <sup>1</sup>	616 ± 23	6,13 ± 0,10
5	10	10	26,5 ± 2,9	0,15 ± 0,02	61,3 ± 3,3	10,2 ± 0,7	591 ± 28	6,16 ± 0,10

Примечание. \* – достоверных различий в показателях эритроцитов, общего числа лейкоцитов, % эозинофилов, тромбоцита не выявлено (данные не показаны). Здесь и в табл. 4: \*\* – надстрочные числовые индексы – номера групп, различие с которыми достоверно,  $p < 0,05$ , *t*-тест Стьюдента и/или критерий Манна – Уитни.

## Уровни цитокинов и хемокинов в сыворотке крови крыс групп 1-5 на 92-е сутки эксперимента

Группа	Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.	Уровни цитокинов**, медиана (интервал изменения); число животных (n)								
		IL-10	IL-12 p70	IL-13	IL-2	IL-4	MIP-3a	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
1	0	0,455 (0,275–0,534) n = 6	1,80 (1,15–2,57) n = 6	0,211 (0,143–0,300) n = 5	4,86 (2,48–6,41) n = 6	0,140 (0,085–0,200) n = 6	0,0751 (0,0438–0,1030) n = 6	34,4 (33,5–38,5) n = 6	1,34 (1,21–1,48) n = 6	0,724 (0,647–0,763) n = 6
2	0,01	0,417 (0,307–0,486) n = 5	1,48 (1,40–2,03) n = 5	0,120 (0,039–0,205) n = 4	3,55 (2,86–6,17) n = 5	0,111 (0,087–0,178) n = 5	0,0723 (0,0469–0,0800) n = 5	35,1 (28,0–37,6) n = 5	1,31 (1,14–1,56) n = 5	0,722 (0,528–0,786) n = 5
3	0,1	0,237 (0,110–0,408)* n = 6	1,34 (0,79–1,90) n = 6	0,073 (0,009–0,277)* n = 6	2,91 (1,56–4,00)* n = 6	0,085 (0,038–0,110)* n = 6	0,0530 (0,0166–0,0633)* n = 6	32,6 (30,9–35,7)* n = 6	1,69 (1,11–2,24) n = 6	0,710 (0,639–0,751) n = 6
4	1,0	0,347 (0,101–0,510) n = 6	1,30 (0,44–1,71)* n = 6	0,156 (0,001–0,205) n = 6	3,39 (1,59–4,61) n = 6	0,099 (0,025–0,129) n = 6	0,0331 (0,0099–0,0993) n = 6	30,0 (25,4–33,0)* n = 6	1,56 (1,12–1,70) n = 6	0,640 (0,556–0,699)* n = 6
5	10	0,346 (0,169–0,541) n = 5	1,52 (0,72–2,31) n = 5	0,177 (0,096–0,432) n = 5	3,52 (1,35–5,90) n = 5	0,120 (0,054–0,164) n = 5	0,0441 (0,0289–0,0622)* n = 5	31,1 (25,6–34,2)* n = 5	1,57 (1,30–1,67)* n = 5	0,687 (0,598–0,703) n = 5

Примечание. \* – различие с группой 1 (контроль) достоверно,  $p < 0,05$ , Т-тест Стьюдента и/или критерий Манна – Уитни; \*\* – различия между группами животных в уровнях GM-CSF, GRO/KC, IL-17A, IL-18, IL-1a, IL-1b, IL-5, IL-6, IL-7, INF-γ, MCP-1, M-CSF, MIP-1a, RANTES, TNF-α, VEGF были недостоверными ( $p > 0,05$ ).

## Результаты

## Подострый эксперимент длительностью 92 суток

Как показали результаты исследования методом проточной цитофлуориметрии (табл. 1), введение крысам в течение 92 суток ОСУНТ с питьевой водой не приводит к снижению числа живых (AnV-FITC(-)7-AAD(-)) гепатоцитов, и, более того, при дозе 0,1 мг/кг наблюдается небольшое, но достоверное ( $p < 0,05$ ) возрастание числа живых клеток. Этому соответствует снижение в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) числа клеток на ранней стадии апоптоза (AnV-FITC(+)-7-AAD(-)). При этом число клеток на поздней стадии апоптоза ((AnV-FITC(+)-7-AAD(+)) не зависит от вводимой дозы ОСУНТ. Количество мёртвых клеток ((AnV-FITC(-)-7-AAD(+)) во всех исследованных образцах ткани было низким (менее 0,2%) и, возможно, является методическим артефактом. Достоверное возрастание этого показателя в группах 2 и 5 может рассматриваться, по-видимому, как биологически незначимое. Таким образом, под действием ОСУНТ не наблюдается существенного усиления процессов апоптоза гепатоцитов.

Анализ гематологических показателей (табл. 2) позволил выявить ряд изменений, которые, однако, не демонстрируют определённой зависимости от дозы наноматериала. Наибольшее число достоверных ( $p < 0,05$ ) сдвигов (снижение в 1,5 раза количества нейтрофилов, в 1,8 раза – базофилов, повышение численности лимфоцитов, некоторое снижение объёма тромбоцитов) наблюдалось при минимальной дозе ОСУНТ – 0,01 мг/кг м.т. Помимо этого при дозе 1 мг/кг м.т. было замечено незначительное по абсолютной величине снижение количества моноцитов. При максимальной дозе наноматериала (10 мг/кг м.т.) никаких изменений в состоянии лимфоцитов, эозинофилов, эритроцитов (данные не представлены) и тромбоцитов животных не наблюдалось.

Основная часть изменений в уровнях цитокинов и хемокинов сыворотки крови, характеризующих иммунный статус животных (табл. 3) также не имела чёткой зависимости «доза – ответ» и проявлялась в наибольшей степени при средних дозах наноматериала. Так, при дозе 0,1 мг/кг м.т. отмечено достоверное снижение уровней цитокинов IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, хемокина MIP-3a, изоформы 1 трансформирующего фактора роста (TGF-β); при дозе 1,0 мг/кг цитокина IL-12 (изоформы массой 70 кД) и изоформ 1 и 3 трансформирующего фактора роста (TGF-β). В отличие от этого изоформа TGF-β2 демонстрировала выраженную тенденцию к возрастанию, которая является, по-видимому, дозозависимой, однако достоверно отличающейся

только в группе 5 ( $p < 0,05$ ). В группе, получавшей наноматериал в максимальной из доз, также следует отметить достоверное снижение уровней изоформы TGF-β1 и хемокина MIP-3a.

При культивации клеток селезенки *ex vivo* наблюдали (табл. 4) снижение продукции IL-18 при дозе ОСУНТ 0,01 мг/кг м.т. и повышение – IL-1b и TNF-α при дозе ОСУНТ 0,1 мг/кг м.т. Указанные цитокины не продемонстрировали ответа на введение ОСУНТ при анализе их уровней *in vivo*.

Содержание большинства облигатных и транзитных популяций микробиоты в содержимом кишечника крыс (табл. 5) не показало достоверной зависимости от введения ОСУНТ.

Приблизительно 10-кратное по абсолютной величине (или на 1 порядок в lg КОЕ/г) возрастание среднего количества бифидобактерий при дозе 0,1 мг/кг м.т. было статистически незначимым. Обращает на себя внимание достоверное подавляющее действие ОСУНТ на рост плесневой флоры при всех использованных дозах наноматериала (максимум в 110 раз по абсолютной величине при дозе 0,01 мг/кг м.т.). При этом содержание дрож-

Таблица 4

Продукция цитокинов *ex vivo* клетками селезенки, полученными от крыс групп 1–5 на 92-е сутки эксперимента

Группа	Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.	Концентрация цитокинов** в среде культивации, медиана (интервал изменения); число животных (n)		
		IL-1β	IL-18	TNF-α
1	0	0,0206 (0,0041–0,0355) <sup>3*</sup> n = 6	0,079 (0,004–0,242) <sup>2</sup> n = 6	0,0012 (0,0008–0,0841) n = 5
2	0,01	0,0222 (0,0017–0,0551) n = 6	0,004 (0,004–0,024) <sup>1</sup> n = 5	0,0010 (0,0008–0,0179) <sup>3</sup> n = 5
3	0,1	0,0391 (0,0351–0,0434) <sup>1</sup> n = 5	0,045 (0,004–0,186) n = 6	0,0712 (0,0012–0,205) <sup>2</sup> n = 6

Примечание. \*\* – различия между группами животных в продукции клетками цитокинов и хемокинов GM-CSF, GRO/KC, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, INF-γ, MCP-1, M-CSF, MIP-1a, MIP-3a, RANTES, VEGF, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 были недостоверными ( $p > 0,05$ ).

Микробиологические показатели содержимого слепой кишки крыс групп 1–5 на 92-е сутки эксперимента

Компоненты микробиома	Группы (по 6 животных в группе) / Доза ОСУНТ, мг/кг м.т.				
	1/0	2/0,01	3/0,1	4/1	5/10
	Содержание, lg КОЕ/г, $M \pm m$				
Общие анаэробы	8,47 ± 0,23	8,54 ± 0,17	8,77 ± 0,12	8,49 ± 0,18	8,86 ± 0,21
Общие аэробы	8,18 ± 0,25	8,21 ± 0,27	8,34 ± 0,12	8,89 ± 0,33	8,71 ± 0,14
Бифидобактерии	7,67 ± 0,33	7,83 ± 0,31	8,67 ± 0,33	7,67 ± 0,33	8,17 ± 0,31
Лактобактерии	7,92 ± 0,29	8,23 ± 0,31	8,50 ± 0,07	8,39 ± 0,17	8,15 ± 0,21
Бактероиды	6,65 ± 0,24	6,30 ± 0,01	6,54 ± 0,19	6,40 ± 0,06	6,75 ± 0,15
Энтеробактерии	6,19 ± 0,58	6,69 ± 0,32	6,48 ± 0,35	6,88 ± 0,55	7,27 ± 0,21
Энтерококки	6,45 ± 0,28	6,58 ± 0,30	6,05 ± 0,31	6,78 ± 0,20	7,01 ± 0,18
Цитратассимилирующие энтеробактерии	6,58 ± 0,49	6,95 ± 0,41	6,86 ± 0,28	7,08 ± 0,49	7,31 ± 0,31
Стафилококки**	6,33 ± 0,18	6,35 ± 0,20	6,38 ± 0,16	6,22 ± 0,07	5,67 ± 0,69
Аэробы гемолитические	6,84 ± 0,28	6,45 ± 0,07	6,38 ± 0,08	7,29 ± 0,66	6,43 ± 0,09
Анаэробы гемолитические	7,55 ± 0,17	7,79 ± 0,17	7,68 ± 0,20	7,38 ± 0,08	8,04 ± 0,29
Дрожжи	5,72 ± 0,30	5,94 ± 0,39	6,32 ± 0,24	6,68 ± 0,24*	6,12 ± 0,37
Плесени	4,41 ± 0,37	2,35 ± 0,05*	2,58 ± 0,14*	3,21 ± 0,42*	3,07 ± 0,29*
Антагонистическая активность бифидобактерий, ед. рН, $M \pm m$	4,34 ± 0,15	4,05 ± 0,13	4,18 ± 0,07	4,24 ± 0,10	4,26 ± 0,17

Примечание. \* – различие с группой 1 достоверно,  $p < 0,05$ , Т-тест Стьюдента и/или непараметрический критерий Манна–Уитни; \*\* – данные для трёх животных из каждой группы.

жей в кишечном содержимом, напротив, возрастало (максимум в 9,1 раза при дозе ОСУНТ 1 мг/кг м.т.). Как и для большинства других изученных показателей, эффекты ОСУНТ в отношении кишечной микробиоты не демонстрировали однозначной зависимости от дозы.

Эксперимент длительностью 28 суток с использованием иммунизации

При введении крысам ОСУНТ с питьевой водой в дозе 0,1 мг/кг м.т. в течение 28 суток выявлен ряд различий с эффектом наноматериала в той же дозе при более длительной, 3-месячной экспозиции. Так, в отличие от предыдущего эксперимента, отмечено (табл. 6) увеличение на 30% числа моноцитов и определённый сдвиг в системе гемопоэза (объём эритроцита и содержание в нём гемоглобина).

Оценка иммунологических показателей (табл. 7) выявила увеличение продукции IL-5, IL-7, GRO(KC), MCP-1, MIP-1a, то есть факторов, для которых при 3-месячном воздействии ОСУНТ было характерно снижение или отсутствие эффекта. Для изоформы TGF-b2 в отличие от эксперимента с введением наноматериала длительностью 92 суток отмечено снижение, тогда как уровень TGF-b1 у экспонированных в данной дозе ОСУНТ животных отвечал в обоих экспериментах сходным образом. Характер влияния ОСУНТ на иммунологические показатели различался также у интактных и иммунизированных животных. Так, у последних фактически получал противоположную направленность эффект ОСУНТ в отношении содер-

жания IL-7, MCP-1; заметным было повышение уровня TNF-a и снижение RANTES, отсутствовавшее у интактных животных.

### Обсуждение

Как было указано выше, иммунорегуляторное влияние ОСУНТ на развитие воспаления, гранулём и фиброза ткани лёгких и печени охарактеризовано в большинстве работ при парентеральном [11, 12] или ингаляционном [6] поступлении в организм лабораторных животных. При этом ключевым фактором цитотоксического действия УНТ является способность клеток связывать их на своей мембране и затем поглощать их [18].

Проведённые исследования показали, что большинство изученных гематологических и иммунологических (цитокины, хемокины) показателей характеризуется сложным характером зависимости от дозы ОСУНТ, и наибольшее число их изменений отмечается при низкой (0,01 мг/кг м.т.) и средней (0,1–1 мг/кг м.т.) дозах. Выявленные эффекты проявляются изменением соотношения гранулоцитов и мононуклеаров периферической крови (МПК) (см. табл. 2, 6), уровней цитокинов (см. табл. 3, 7) и регуляции апоптогенных процессов (см. табл. 1). Это согласуется с данными о том, что ОСУНТ длиной более 1 мкм при пероральном введении мышам в очень высокой дозе (1000 мг/кг м.т.) не продемонстрировали никаких признаков токсичности [11]. В работе [19] при изучении в культуре клеток высоких концентраций МУНТ и ОУНТ методами протеомики были выявлены изменения в экспрессии только нескольких десятков

Таблица 6

Гематологические показатели\* (лейкоциты, эритроциты) крови крыс групп 1a–4a на 29-е сутки эксперимента

Группа	Число животных, $n$	Показатели лейкоцитов, $M \pm m$				Показатели эритроцитов, $M \pm m$		
		нейтрофилы, %	базофилы, %	лимфоциты, %	моноциты, %	гематокрит, %	объём клетки, мкм <sup>3</sup>	Гемоглобин в 1 клетке, пг
1a. Контроль	9	21,9 ± 2,8	0,41 ± 0,06	64,5 ± 2,9	11,8 ± 1,0	45,2 ± 0,6	56,2 ± 0,7	18,8 ± 0,3
2a. Контроль + иммунизация	10	27,5 ± 2,2	0,41 ± 0,07	57,7 ± 3,6	10,2 ± 0,6	42,7 ± 0,7*	55,3 ± 0,9	18,5 ± 0,3
3a. ОСУНТ	8	22,0 ± 1,6	0,44 ± 0,07	57,9 ± 3,1	15,5 ± 1,4*	43,4 ± 1,4	53,8 ± 0,5*	17,8 ± 0,2*
4a. ОСУНТ + иммунизация,	9	25,0 ± 1,7	0,44 ± 0,08	60,7 ± 2,1	11,6 ± 1,1	44,8 ± 1,0	54,9 ± 0,7	18,2 ± 0,2

Примечание. \* – различие с группой 1a достоверно,  $p < 0,05$ , Т-тест Стьюдента и/или непараметрический критерий Манна – Уитни.

Уровни цитокинов в сыворотке крови крыс в зависимости от воздействия ОСУНТ и иммунизации в эксперименте продолжительностью 28 суток

Группа	Концентрация цитокинов*** в сыворотке крови (интервал изменения); медиана (интервал изменения); число животных (n)													
	GM-CSF	GRO/KC	IL-18	IL-1β	IL-5	IL-7	MCP-1	M-CSF	MIP-1a	MIP-3a	RANTES	TNF-α	TGF-β1	TGF-β2
1-я, контроль	0,171 (0,054-0,258) n=5	0,189 (0,169-0,341) n=5	2,18 (1,28-2,54) n=5	0,436 (0,133-0,599) n=5	2,47 (2,22-2,67) n=5	0,342 (0,177-0,490) n=5	1,13 (0,87-2,09) n=5	0,068 (0,025-0,076) n=5	0,071 (0,034-0,124) n=5	0,058 (0,034-0,068) n=5	1,48 (1,16-2,93) n=5	1,05 (0,51-1,77) n=5	30,3 (19,7-31,4) n=5	1,40 (1,20-1,54) n=5
2-я, контроль + иммунизация	0,254 (0,113-0,436) n=6	0,303 (0,215-0,529) n=6	1,52 (1,17-1,91) n=6	0,674 (0,279-1,43) n=6	2,40 (2,03-2,82) n=6	0,546 (0,274-1,25) n=6	1,66 (1,40-1,99) n=6	0,028 (0,006-0,047) n=6	0,160 (0,061-0,459) n=6	0,0350 (0,028-0,057) n=5	2,06 (1,90-2,32) n=6	0,88 (0,43-0,98) n=5	30,5 (25,2-34,1) n=6	1,58 (1,03-1,71) n=6
3-я, ОСУНТ	0,259 (0,117-0,432) n=6	0,326 (0,275-0,430) n=6	1,89 (1,65-2,68) n=5	0,676 (0,302-1,18) n=6	2,77 (2,48-2,97) n=6	0,566 (0,334-1,11) n=6	2,12 (1,67-2,59) n=6	0,035 (0,009-0,060) n=6	0,145 (0,072-0,394) n=6	0,068 (0,030-0,110) n=6	2,78 (1,69-4,67) n=6	1,04 (0,43-1,49) n=6	19,6 (13,4-25,7) n=6	1,15 (1,12-1,20) n=6
4-я, ОСУНТ + иммунизация	0,146 (0,054-0,205) n=6	0,292 (0,127-0,539) n=6	2,30 (0,51-2,39) n=6	0,353 (0,136-0,498) n=6	2,61 (2,07-2,85) n=6	0,325 (0,205-0,465) n=6	1,34 (1,00-1,63) n=6	0,039 (0,032-0,052) n=6	0,0662 (0,029-0,106) n=6	0,0515 (0,026-0,097) n=6	1,66 (1,35-1,97) n=6	1,41 (0,84- 1,65) n=6	29,4 (26,5-32,9) n=6	1,34 (1,27-1,43) n=6

Примечание. \* – различие с группой 1 (контроль) достоверно; \*\* – различие с группой 2 (контроль + иммунизация) достоверно;  $p < 0,05$ ; Т-тест Стьюдента и/или критерий Манна – Уитни; \*\*\* – достоверных различий в уровнях IL-10, IL-17A, IL-13, IL-12p70, IL-6, INF-γ не выявлено (данные не показаны).

белков, тогда как при низкой дозе обоих наноматериалов число таких белков составляло несколько сотен.

Биоинформатический анализ позволил соотнести выявленные протеомные маркеры с процессами некроза и апоптоза, межклеточной передачи сигнала, контактного взаимодействия клеток, пролиферации, противомикробной резистентности, транспорта макромолекул и синтеза белка. Для большинства белков отмечалось снижение экспрессии, что интерпретировалось как следствие развития общего стресса. Кластеризация протеомных биомаркеров с построением биоинформатических сетей показала, что ряд белков неизменно оказывался в их центре. Это было характерно для кадгерина 1 (CDH1), STAT1, белка адгезионных клеточных контактов (JUP) – плакоглобина и фактора PYCARD, вовлечённого в механизмы регуляции апоптоза.

При пероральном введении ОСУНТ мышам в дозе от 0,05 до 2,5 мг/кг м.т. было выявлено поражение кишечника с появлением участков воспаления и ростом секреции провоспалительных цитокинов, в частности, IL-1β, IL-6 и TNF-α [20]. Общеизвестно, что подобные воспалительные изменения имеют, как правило, системный характер и вызывают различной выраженности изменения состава периферической крови. Что примечательно, изменения подобной направленности для дозы 0,1 мг/кг м.т., изученной в данном исследовании, были выявлены для двух из указанных выше цитокинов - IL-1β и TNF-α.

По сравнению с большинством показателей цитокинового профиля уровень TGF-β2 достоверно повышался при максимальной дозе наноматериала. Известно, что трансформирующий фактор роста TGF-β относится к маркерам воспалительных реакций, развивающихся под действием МУНТ [21] и ОСУНТ [22] при ингаляционном воздействии. На важную роль TGF-β в качестве маркера фиброза, вызываемого ОСУНТ, указывают и данные исследований *in vitro* [23]. Выработка этого хемокина фибробластами положительно коррелировала с длиной ОСУНТ, при том, что более длинные нанотрубки обладали на этой модели большим фиброгенным потенциалом.

Можно предположить, что при наибольшей дозе ОСУНТ, когда проявляется экскреция значительных их количеств с фекалиями животных, происходит вторичная ингаляционная экспозиция аэрозолем наноматериала через подстилку по аналогии с тем, как это наблюдали в работе [24] для МУНТ, следствием чего может быть усиление продукции указанной изоформы TGF-β. Однако в условиях перорального поступления уровни других изоформ TGF при низких и средних дозах наноматериала, напротив, снижаются, что указывает на отсутствие прямого провоспалительного действия. По данным [20] в развитии спектра воспалительных изменений в кишечнике, ключевую роль при достаточно длительной экспозиции, вероятно, играет именно TGF-β2.

Наблюдаемое при дозе ОСУНТ 0,1 мг/кг м.т. согласованное снижение уровней IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, MIP-3a (см. табл. 3) может указывать на активацию каскада NLRP3-инфламмосом и запуск процессов острого воспаления, проявляющегося в изменении цитокинового профиля. При воздействии УНТ на культуры макрофагов, предварительно активированных липополисахаридом, индуцировалась секреция IL-1β [25]. В настоящем исследовании данный факт получил подтверждение в оценке продукции цитокинов *ex vivo* (см. табл. 7). Активация комплекса NLRP3-инфламмосомы, вызванная УНТ, осуществляется посредством зависимой от STAT6 отрицательной регуляции прокаспазы 1, а продуцируемые Th2 противовоспалительные цитокины, включая IL-4 и IL-13, являются супрессорами указанного процесса.

При нарастании доз ОСУНТ от 0,01 до 1,0 мг/кг м.т. преобладающим является снижение уровня IL-12p70 с наибольшим эффектом при 1,0 мг/кг м.т., согласующееся с одновременным изменением концентраций других про- и противовоспалительных цитокинов и изменениями в лейкоцитарной формуле (см. табл. 2-4). Указанные эффекты могут свидетельствовать о снижении совместного действия провоспалительных факторов при малых и средних дозах ОСУНТ, одним из проявлений которого становится наблюдаемое при потреблении 0,1 мг/кг м.т. ОСУНТ подавление апоптоза гепатоцитов (см. табл. 1). При этом существенно, что какого-либо снижения провоспалительного по-

тенциала иммунокомпетентных клеток не отмечается, о чём свидетельствуют данные *ex vivo* о продукции IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в культурах клеток селезёнки (табл. 4), полученные от этих животных. Таким образом, есть основание предполагать о наличии некоторого системного противовоспалительного фактора, действующего при поступлении низких доз ОСУНТ в организм и сдерживающего продукцию провоспалительных цитокинов. Одним из таких факторов, по-видимому, может быть профиль абсорбируемых метаболитов кишечной микрофлоры.

Как показали проведённые исследования, ОСУНТ в низких дозах оказывали выраженное ингибирующее действие на развитие транзитной плесневой флоры, представители которой способны продуцировать токсические продукты, в том числе обладающие провоспалительным, антибактериальным и сенсибилизирующим действием [26, 27]. Такие сдвиги в кишечной микрофлоре крыс, возможно, связаны именно с антимикробными эффектами ОСУНТ, известными из литературы [28].

ОСУНТ в дозе 0,1 мг/кг м.т. при 28-дневной экспозиции существенно не повлияли на уровень секреции *in vivo* ключевых цитокинов, отвечающих за продукцию иммуноглобулинов, чему соответствовало отсутствие различий в уровнях вырабатываемых специфических антител у иммунизированных животных. Однако иммунизация ОВА оказала выраженное модулирующее действие на иммунотропные эффекты ОСУНТ, проявившиеся снижением уровней большинства хемокинов (см. табл. 7) по сравнению с простым влиянием ОСУНТ в течение 28 дней. В тоже время тенденция к росту уровней IL-18 и TNF- $\alpha$  как в сыворотке при 28-дневном эксперименте (см. табл. 7), так и в культурах клеток селезёнки при 92-дневной экспозиции 0,1 мг/кг м.т. (см. табл. 4) может свидетельствовать о сохраняющемся системном воспалительном процессе в ответ на введение ОСУНТ [29, 30].

## Заключение

Таким образом, в результате 28- и 92-суточной пероральной экспозиции крыс водными дисперсиями ОСУНТ последние продемонстрировали ряд эффектов в отношении иммунологических, гематологических показателей организма и состояния апоптоза печени, не имеющих однозначной направленности и не демонстрирующих определённой зависимости от дозы наноматериала. Лежащие в основе этих эффектов механизмы предположительно могут быть связаны с системными противовоспалительными эффектами, обусловленными подавлением роста плесневой флоры кишечника, в составе которой присутствуют потенциально патогенные и микотоксиногенные представители, а также возможным снижением под действием ОСУНТ проницаемости кишечного барьера для белковых антигенов [10]. Немонотонный характер большинства зависимостей доза – ответ обусловлен, по-видимому, процессами агрегации ОСУНТ, что следует принимать во внимание при оценке биологического действия их малых и сверхмалых доз, представленных в объектах окружающей среды при реальных сценариях экспозиции.

**Финансирование.** Работа проведена за счёт средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема ФАНО России № 0529-2014-0045).

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают, что не существует известных конфликтов интересов, связанных с этой публикацией.

## Литература

(пп. 1–12, 14, 15, 18–25, 28–30 см. Referencrs)

- Хрипач Л.В., Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Князева Т.Д., Коганова З.И., Железняк Е.В. и др. Влияние углеродных нанотрубок и активированного угля на биохимические показатели состояния организма при хроническом введении препаратов крысам с питьевой водой. *Гигиена и санитария*. 2014; 5: 36-42.
- Распопов Р.В., Трушина Э.Н., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Биодоступность наночастиц оксида железа при использовании их в питании. Результаты экспериментов на крысах. *Вопросы питания*. 2011; 80(3): 25-30.
- Лимфоциты: Методы. Под ред. Дж. Клауса. М.: Мир; 1990. 395 с.

- Батищева С.Ю., Кузнецова Г.Г., Быкова И.Б., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. Влияние плесневых грибов, потребляемых с пищей, на кишечную микрофлору у крыс. *Вопросы питания*. 2009; 78(2): 43-7.
- Шевелева С.А., Гмошинский И.В., Болтянская Э.В., Ефимочкина Н.Р., Зорин С.Н., Мазо В.К. Влияние потребляемых с пищей спор плесеней на протекание системной анафилактики у крыс. *Вопросы питания*. 2004; 73(6): 43-7.

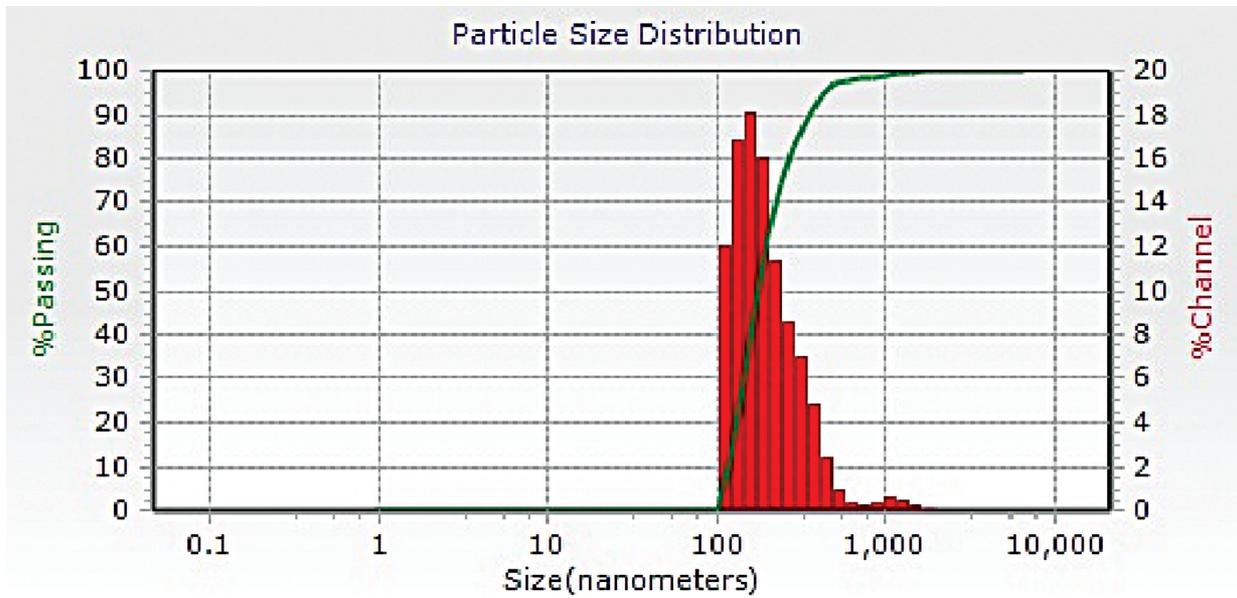
## References

- De Volder M.F., Tawfick S.H., Baughman R.H., Hart A.J. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*. 2013; 339(6119): 535-9. Doi: 10.1126/science.1222453.
- Coyuco J.C., Liu Y., Tan B.-J., Chiu G.N.C. Functionalized carbon nanomaterials: exploring the interactions with Caco-2 cells for potential oral drug delivery. *Int. J. Nanomedicine*. 2011; 6: 2253-63. Doi: 10.2147/IJN.S23962.
- Monaco A.M., Giugliano M., Beilstein J. *Nanotechnol.* 2014; 5: 1849-1863. Doi: 10.3762/bjnano.5.196.
- Martínez-Ballesta M.C., Zapata L., Chalbi N., Carvajal M. Multi-walled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. *J. Nanobio-technology*. 2016; 14: 42.
- Vasyukova I.A., Gribanovskii S.L., Gusev A.A., Ubogov A.Yu., Khaliullin T.O., Fatkhutdinova L.M. et al. Assessment of reproductive toxicity of multiwalled carbon nanotubes and their putative effects on population ecology of mouse-like rodents. *Nanotechnol. Russ.* 2015; 10(5-6): 458-67.
- Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R., Murray A.R., Johnson V.J., Potapovich A.I. et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 289(5): 698-708. Doi: 10.1152/ajplung.00084.2005.
- Kobayashi N., Izumi H., Morimoto Y. Review of toxicity studies of carbon nanotubes. *J. of Occup. Health*. 2017; 59(5): 394-407.
- Li J., Li L., Chen H., Chang Q., Liu X., Wu Y. et al. Application of vitamin E to antagonize SWCNTs-induced exacerbation of allergic asthma. *Sci. Rep.* 2014; 4: 4275. Doi: 10.1038/srep04275.
- Park E.J., Choi J., Kim J.H., Lee B.S., Yoon C., Jeong U. et al. Subchronic immunotoxicity and screening of reproductive toxicity and developmental immunotoxicity following single instillation of HIPCO-single-walled carbon nanotubes: purity-based comparison. *Nanotoxicology*. 2016; 10(8): 1188-1202. Doi: 10.1080/17435390.2016.1202348.
- Madani S.Y., Mandel A., Seifalian A.M. A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Reviews*. 2013; 4: 21521. Doi: 10.3402/nano.v4i0.21521.
- Kolosnjaj-Tabi J., Hartman K.B., Boudjemaa S., Ananta J.S., Morgant G., Szwarc H. et al. In vivo behavior of large doses of ultra-short and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. *ACS Nano*. 2010; 4(3): 1481-92. Doi: 10.1021/nn901573w
- Campagnolo L., Massimiani M., Palmieri G., Bernardini R., Sacchetti C., Bergamaschi A. et al. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part. and Fibre Toxicol.* 2013; 10: 21. Doi: 10.1186/1743-8977-10-21.
- Khripach L.V., Rakhmanin Yu.A., Mikhailova R.I., Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Zheleznyak E.V. et al. Biochemical effects of chronic peroral administration of carbon nanotubes and activated charcoal in drinking water in rats. *Gigiena i sanitariya*. 2014; 5: 36-42 (in Russian).
- Allegri M., Perivoliotis D.K., Bianchi M.G., Chiu M., Pagliaro A., Koklioti M.A. et al. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol. Rep.* 2016; 3: 230-243. Doi: 10.1016/j.toxrep.2016.01.011.
- Shipelin V.A., Shumakova A.A., Masyutin A.G., Chernov A.I., Sidorova Yu.S., Gmoshinski I.V. et al. In vivo subacute oral toxicity assessment of multiwalled carbon nanotubes: characterisation of nanomaterial and integral indicators. *Nanotech. Russ.* 2017; 12(9-10): 559-68. Doi: 10.1134/S199507801705010X.

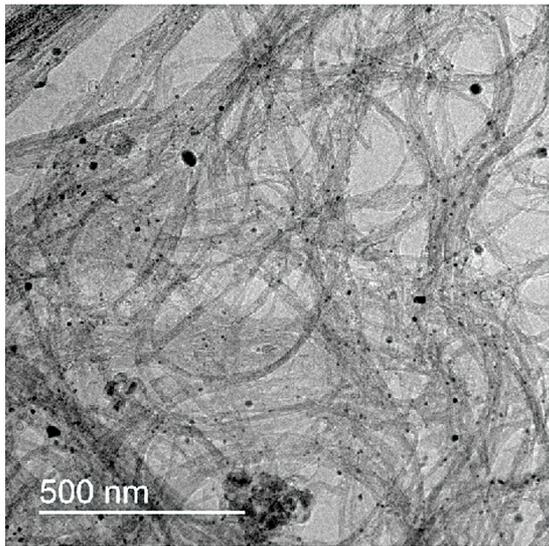
16. Raspopov R.V., Trushina E.N., Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A. Bioavailability of nanoparticles of ferric oxide when used in nutrition. Experimental results in rats. *Voprosy pitaniya*. 2011; 80(3): 25-30 (in Russian).
17. *Lymphocytes. A practical approach*. Ed. by Klaus G.G.B. Oxford, Washington D.C.: IRI Press. 1987, 395 p.
18. Jin H., Heller D.A., Sharma R., Strano M.S. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 149-58. Doi: 10.1021/nm800532m.
19. Li P., Lai X., Frank A., Witzmann F.A., Blazer-Yost B.L. Bioinformatic Analysis of Differential Protein Expression in Calu-3 Cells Exposed to Carbon Nanotubes. *Proteomes*. 2013; 1(3): 219-39. Doi: 10.3390/proteomes1030219.
20. Chen H., Zhao R., Wang B., Zheng L., Ouyang H., Wang H. et al. Acute oral administration of single-walled carbon nanotubes increases intestinal permeability and inflammatory responses: association with the changes in gut microbiota in mice. *Adv. Healthc. Mater.* 2018. Doi: 10.1002/adhm.201701313.
21. Polimeni M., Gulino G.R., Gazzano E., Kopecka J., Marucco A., Fenoglio I. et al. Multi-walled carbon nanotubes directly induce epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via the TGF- $\beta$ -mediated Akt/GSK-3 $\beta$ /SNAIL-1 signalling pathway. *Part. Fibre Toxicol.* 2015; 13(1): 27. Doi: 10.1186/s12989-016-0138-4.
22. Azad N., Iyer A.K., Wang L., Liu Y., Lu Y., Rojanasakul Y. Reactive oxygen species-mediated p38 MAPK regulates carbon nanotube-induced fibrogenic and angiogenic responses. *Nanotoxicology*. 2013; 7(2): 157-68. Doi: 10.3109/17435390.2011.647929.
23. Amruta M., Luanpitpong S., Dong C., Wang L., He X., Battelli L. et al. Effect of fiber length on carbon nanotube-induced fibrogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(5): 7444-61. Doi: 10.3390/ijms15057444.
24. Albini A., Pagani A., Pulze L., Antonino B., Principi E., Congiu T. et al. Environmental impact of multi-wall carbon nanotubes in a novel model of exposure: systemic distribution, macrophage accumulation, and amyloid deposition. *Int. J. Nanomedicine*. 2015; 10: 6133-45. Doi: 10.2147/IJN.S85275.
25. Shipkowski K.A., Taylor A.J., Thompson E.A., Glista-Baker E.E., Sayers B.C., Messenger Z.J. et al. An allergic lung microenvironment suppresses carbon nanotube-induced inflammasome activation via STAT6-dependent inhibition of caspase-1. *PLoS One*, 2015; 10(6): e0128888. Doi: 10.1371/journal.pone.0128888/
26. Batishcheva S.Yu., Kuznetsova G.G., Bykova I.B., Efimochkina N.R., Sheveleva S.A. Influence of molds consumed with food on intestinal microflora in rats. *Voprosy pitaniya*. 2009; 78(2): C.43-47 (in Russian).
27. Sheveleva S.A., Gmshinski I.V., Boltyanskaya E.V., Efimochkina N.R., Zorin S.N., Mazo V.K. The effect of mold spores consumed with food on the course of systemic anaphylaxis in rats. *Voprosy pitaniya*. 2004; 73(6): 43-47 (in Russian).
28. Kang S., Mauter M.S., Elimelech M. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. *Environ Sci. Technol.* 2009; 43(7): 2648-53.
29. Bhattacharya K., Andón F.T., El-Sayed R., Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013; 65(15): 2087-97. Doi: 10.1016/j.addr.2013.05.012.
30. Park E.J., Cho W.S., Jeong J., Yi J., Choi K., Park K. Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. *Toxicology*. 2009; 259(3): 113-21. Doi: 10.1016/j.tox.2009.02.009.

Поступила 10.05.2018

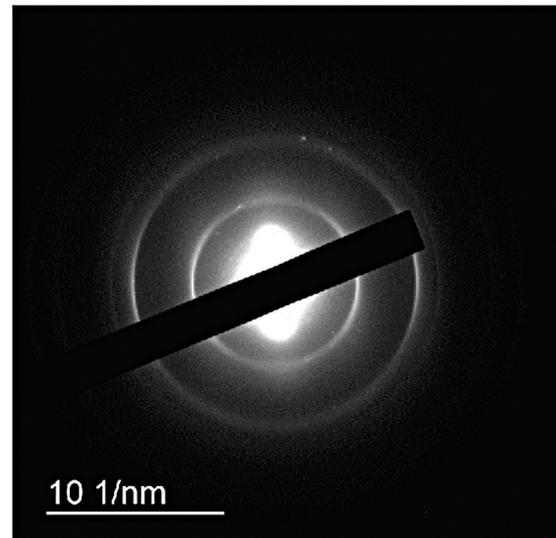
Принята к печати 18.10.2018



a



б



в

Результаты инструментальной характеристики водной дисперсии ОСУНТ: *a* – распределение частиц по гидродинамическому диаметру в методе динамического рассеяния света: ось абсцисс – гидродинамический диаметр, нм; ось ординат, слева – количество частиц (%) с диаметром не больше данного (кривая), справа – количество частиц (%) в данном интервале диаметров (гистограмма) (прибор Nanotracs Wave, Microtrack Inc., США); *б* – репрезентативная микрофотография; *в* – дифракционная картина частиц МУНТ, осаждённых на подложку (просвечивающий электронный микроскоп Jeol 2100 (Jeol, Япония), увеличение  $\times 50\,000$ ).