

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТРЁХ ТИПОВ УГЛЕРОДНЫХ НАНОВОЛОКОН НА ОРГАНЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

В.В. ЧАЙКА*, А.А. СЕРГИЕВИЧ*, Н.В. САЯПИНА**, Т.А. БАТАЛОВА**, И.В. МИШАКОВ***,
А.А. ВЕДЯГИН***, К.С. ГОЛОХВАСТ*

* *Дальневосточный федеральный университет, ул. Суханова, 8, Владивосток, 690000, Россия, e-mail: altexes@mail.ru*

** *Амурская государственная медицинская академия, ул. Горького, 95, г. Благовещенск, Амурская область, 675000, Россия*

*** *Институт катализа им. Г.К. Борескова, Академика Лаврентьева пр-т, д. 5, Новосибирск, 630090, Россия*

Аннотация. Применение наноматериалов, согласно имеющимся на сегодняшний день данным, поднимает ряд вопросов об экологической безопасности и оценки возможных рисков. Последнее требует тщательного изучения механизмов отрицательного токсического или положительного биологического эффектов на организменном, системном и клеточном уровнях, что позволит раскрыть их уникальные реакционные способности изменять физико-химические свойства окружающей жидкостной среды. В настоящей работе представлены результаты исследования влияния 3 типов углеродных нановолокон на организм крыс линии Вистар при пероральном введении с пищей в дозе 500 мг/кг тела в течение 14 дней. Углеродные нановолокна по результатам электронной микроскопии имели линейные размеры: средний диаметр 85 нм и длину 5-50 мкм. Показано влияние нановолокон на гистологическое строение желудка, кишечника и печени крыс. Отмечается ответная реакция на механическое раздражение: повышенное слизеобразование, утолщение слизистой, увеличение лимфоидных фолликулов, и, в ряде случаев, вакуолизация и некроз. Таким образом, показано выраженное влияние наноматериалов на гистологическое строение органов пищеварительной системы после перорального применения и существует необходимость дальнейшего изучения данного вопроса ввиду высокой важности технологического процесса получения перспективных наноматериалов. Полученные данные согласуются с данными других авторов.

Ключевые слова: углеродные нановолокна, токсичность, крысы Вистар.

MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE 3 TYPES OF CARBON NANOFIBRES EFFECTS ON DIGESTIVE ORGANS IN VISTAR RATS DURING ORAL INTRODUCTION

V.V. TCHAIKA*, A.A. SERGIEVICH*, N.V. SAYAPINA**, T.A. BATALOVA**, I.V. MISHAKOV***,
A.A. VEDYAGIN***, K.S. GOLOKHAVAST*

* *Far Eastern Federal University, Suchanov str., 8, Vladivostok, 690000, Russia, e-mail: altexes@mail.ru*

** *Amur State Medical Academy, Gorkogo str., 95, Blagoveschensk, 675000, Russia*

*** *G.K. Boreskov Institute of catalysis, Ak. Lavrenyeteva str., 5, Novosibirsk, 630090, Russia*

Abstract. The use of nano-materials, according to currently available data, raises a number of questions about the environmental safety and risk-assessment. It requires careful study of the toxic mechanisms of negative or positive biological effects at the organism, systemic and cellular levels that will reveal their unique reactivity to modify physico-chemical properties of the surrounding liquid environment. Results of research of the 3 types of carbon nanofibres effects on an organism of Vistar rats at oral introduction with food in a dose of 500 mg/kg of a body within 14 days are presented. Carbon nanofibres by results of electronic microscopy had the linear sizes: average diameter is 85 nanometers and length of 5-50 microns. Influence of nanofibres on a histologic structure of a stomach, intestines and a liver of rats is shown. Response to mechanical irritation is noted: the raised slime production, a thickening mucous, increase in lymphoid follicles, and in some cases, a vacuolation and a necrosis. Thus, it is shown a marked effect of nano-materials on the histological structure of the digestive system after oral administration. So there is a need for further study of this issue due to the high importance of the technological process of obtaining of promising nano-materials. The obtained data are consistent with the data of other authors.

Key words: carbon nanofibers, toxicity, Wistar rat.

В последнее время на углеродные нановолокна обращают всё больше внимания [2, 4-6, 8, 11].

Их применяют в широкой области технологии, в том числе, от текстильной промышленности, для производства нанотканей [3] до сорбции токсичных соединений и адресной доставки лекарств [9].

Но, как показывают данные исследователей, существует опасность для окружающей среды и здоровья человека при применении наноматериалов, в том числе, нановолокон, [7, 10, 12]. Углеродные нанотрубки и нановолокна могут быть более токсичными, чем кварцевые волокна. Как сообщается в одной из работ [1], заметная цитотоксичность однослойных нанотрубок наблюдается при 6-часовой экспозиции и увеличивается на 35% при повышении концентрации трубок до 11,3 мкг/см².

Цель данной работы изучить морфологические изменения в пищеварительном тракте у животных при пероральном применении 3 типов углеродных нановолокон.

Материал и методы исследования. Все опыты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Перед выполнением работ всех животных содержали в одинаковых условиях. Не менее 10 дней перед началом эксперимента крысы получали полноценный пищевой рацион в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977).

Для определения влияния углеродных нановолокон (УНВ) на морфологию внутренних органов при пероральном введении использованы самцы крыс линии Вистар массой 300 г. Они получали УНВ с пищей в дозировке 500 мг/кг массы тела в течение 14 дней. УНВ перемешивали с едой (стандартный комбикорм) и контролировали процесс поедания.

Животных разделяли на 4 экспериментальные группы по 10 особей в каждой, в том числе: «Контроль» - животные, которые не получали минералы, «КМ2» - крысы, получавшие УНВ КМ2-56-БР, «БР» - крысы, получавшие УНВ 56-БР, «ОБР» - крысы, получавшие УНВ 56-ОБР.

Углеродные нановолокна были синтезированы в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (Новосибирск) путём каталитического разложения пропан-бутановой смеси (C₃-C₄) на гетерогенном катализаторе 90%NiO+10%Al₂O₃, приготовленном методом соосаждения нитратов никеля и алюминия. Синтез проводили на установке с роторным реактором при 500°C. Выход углеродного продукта составил 24 г/г (кат). Морфология полученных углеродных нитей соответствовала коаксиально-коническому типу. Полученный образец (56БР) был разделен на 3 части. Вторая часть была обработана в концентрированной азотной кислоте (30 мин), что позволило удалить дисперсные частицы никеля из состава углеродного материала (56-ОБР). Третья часть исходного материала 56БР была подвергнута влажному размолу в керамической мельнице в суспензии с водой в течение 24 часов (КМ2-56БР). По данным электронной микроскопии, средний диаметр углеродных нитей во всех трех образцах составил 85 нм и не менялась при обработке, а длина нитей немного уменьшилась при размельчении. Длина нитей колебалась в пределах 5-50 мкм. Характеристика разных УНВ приводится в табл. 1.

Таблица 1

Физико-химические параметры УНВ, взятых в эксперимент

Характеристика	Диаметр УНВ, нм	Длина УНВ, мкм	Площадь удельной поверхности УНВ, м ² /г
56-БР	от 20 до 200 (в среднем 85)	5-50	105
КМ2-56-БР			103
56-ОБР			125

УНВ представляли собой агрегаты разного размера (рис. 1).

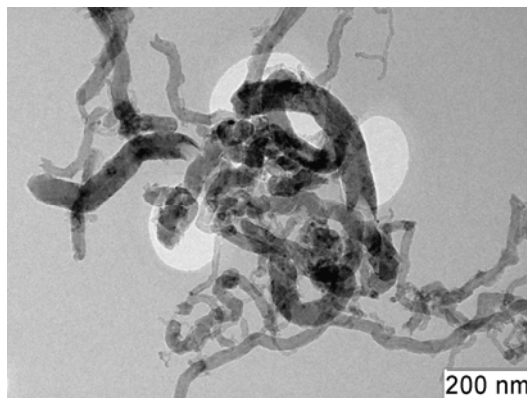


Рис. 1. Агрегат углеродных нановолокон БР-56. Электронная трансмиссионная микроскопия. Измерительный отрезок 200 нм

Гранулометрический анализ размера агрегатов УНВ проводили на лазерном анализаторе частиц *Analysette 22 NanoTech* (фирма *Fritsch*).

Забор материала осуществлялся после наркотизации крысы внутримышечным введением 0,5 мл 5% раствора кетамина. Блоки фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина «*Histoline*» (Элемент, Россия), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в парафин «*Histomix Extra*» (БиоВитрум, Россия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы, окрашивали гематоксилин-эозином, изучали под световым микроскопом «*Zeiss Axio Observer A1*» (*Zeiss*, Германия), для фотосъемки – «*Axio Cam 3*» (*Zeiss*, Германия) и программу компьютерной морфометрии «*AxioVision 4.2*».

Результаты и их обсуждение. УНВ при введении животным с кормом не выявлялись в виде индивидуальных структур и были представлены агрегатами разного размера.

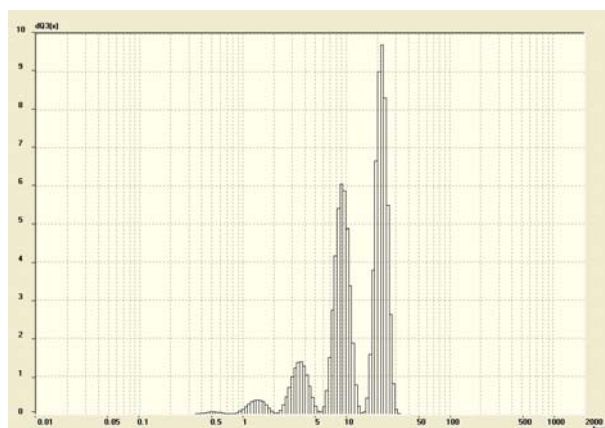


Рис. 2. Распределение агрегатов УНВ 56-БР по размеру и их доля (%) в типовом образце

Для удобства результаты лазерной гранулометрии сведены в табл. 2.

Таблица 2

Физико-химические параметры УНВ, взятых в эксперимент

Характеристика	Средний арифметический диаметр агрегатов УНВ, мкм	Площадь удельной поверхности агрегатов УНВ, см ² /см ³
56-БР	14,52	7549,34
КМ2-56-БР	25,22	8983,11
56-ОБР	–	–

Как можно видеть агрегаты обладают высокой площадью удельной поверхности и могут сорбировать биомолекулы и нарушать ход нормальных биохимических и физиологических процессов.

Гистологическое строение ткани желудка (рис. 3а и б), при световой микроскопии в экспериментальных группах животных, получавших с кормом УНВ, выявило ряд отличий от контроля.

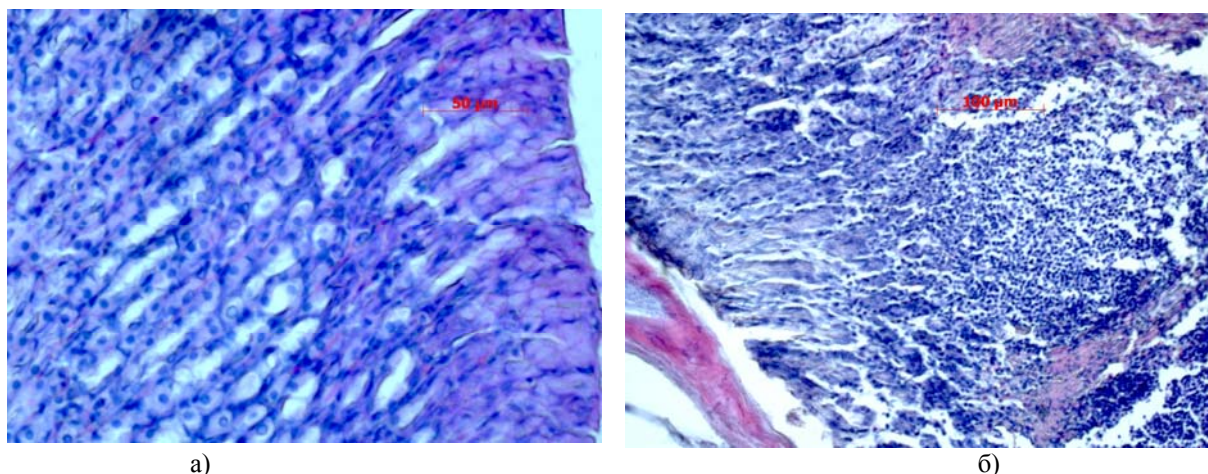


Рис. 3. Гистологическое строение желудка у крыс при введении УНВ разных типов. а) Желудок крысы в группе КМ2. Поверхностный слой слизистой желудка отсутствуют ядра, граница клеток стерта. Окраска гематоксилин-эозином. б) Желудок крысы в группе 56-ОБР. Крупный лимфоидный фолликул. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение а) $\times 400$, б) $\times 200$

В целом, в группах 56-БР, КМ2 и 56-ОБР отмечается утолщение слизистой оболочки желудка по отношению к группе «Контроль», что является следствием механического раздражения УНВ. Подслизистая и серозная оболочка, гладкая мускулатура во всех группах без патологических изменений. Сосуды полнокровны, но стаза не отмечается.

В группе КМ2 в поверхностных слоях слизистой оболочки отмечаются дистрофические изменения и некрозы (рис. 2а). Ядра здесь не прослеживаются, границы клеток стерты. В группе 56-ОБР отмечается в подслизистой оболочке множественные лимфоидные фолликулы (рис. 2б).

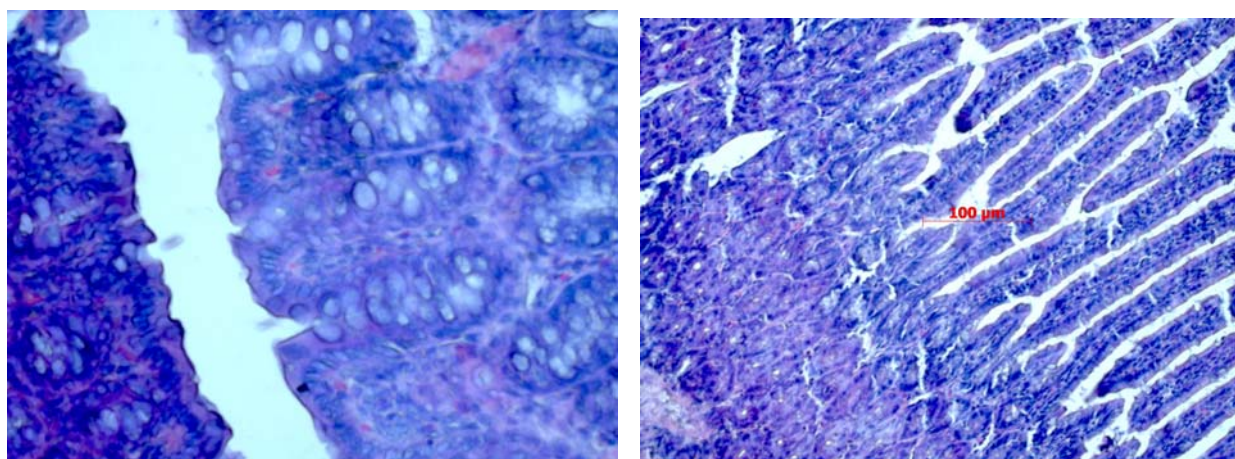
Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах приводится в табл. 3.

Таблица 3

Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах, мкм

Группа	Длина ядра	Ширина ядра	Площадь ядра	Длина клетки	Ширина клетки	Площадь клетки
Контроль	5,11 \pm 0,46	4,46 \pm 0,46	16,29 \pm 2,58	11,55 \pm 1,5	9,05 \pm 1,46	69,47 \pm 14,74
КМ2	5,41 \pm 0,6	4,69 \pm 0,56	18,62 \pm 3,17	12,22 \pm 1,37	10,24 \pm 1,31	85,05 \pm 15,24
БР	5,15 \pm 0,68	4,49 \pm 0,44	16,85 \pm 3,18	11,6 \pm 1,55	9,32 \pm 1,06	73,3 \pm 12,29
ОБР	5,49 \pm 0,61	4,73 \pm 0,53	18,59 \pm 3,51	12,18 \pm 1,31	9,76 \pm 1,04	78,95 \pm 14,61

Гистологическое строение кишечника (рис. 4а и б), при световой микроскопии в экспериментальных группах выявило ряд отличий от контроля.



а)

б)

Рис. 4. Гистологическое строение кишечника у крыс при введении УНВ разных типов.

а) Кишечник крысы в группе КМ2. Отмечается множество вакуолей.

Окраска гематоксилин-эозином. б) Кишечник крысы в группе 56-ОБР. Отмечается множество вакуолей.

Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение а) $\times 400$, б) $\times 200$

В слизистой оболочке в группах КМ2, 56-БР и 56-ОБР наблюдается выраженное слизиобразование. В эпителии множество бокаловидных клеток с вакуолями, заполненными слизью (рис. 4а и 4б). Сосуды полнокровны.

В группе 56-БР и 56-ОБР в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликул. Других патологических изменений не обнаружено.

Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в контрольной группе и при введении приводятся в табл. 4.

Таблица 4

Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в экспериментальных группах животных, мкм

группа	длина ядра	ширина ядра	площадь ядра	длина клетки	ширина клетки	площадь клетки
Контроль	4,96 \pm 0,66	3,81 \pm 0,65	12,84 \pm 2,86	14,34 \pm 2,97	8,64 \pm 2,28	60,67 \pm 14,7
КМ2	5,63 \pm 1,07	4,12 \pm 0,85	16 \pm 3,7	16,5 \pm 2,1	7,25 \pm 1,52	76,71 \pm 11,13
БР	6,2 \pm 0,74	4,5 \pm 0,77	18,54 \pm 3,34	17,68 \pm 1,74	6,79 \pm 1,08	85,32 \pm 10,81
ОБР	5,36 \pm 0,74	4,1 \pm 0,7	15,15 \pm 2,56	14,7 \pm 1,6	5,77 \pm 0,57	68,16 \pm 5,56

Ткани печени во всех экспериментальных группах не отличается от контрольной. Не было выявлено никаких патологических признаков: дистрофии, некроза, отека, воспаления. Можно лишь отметить, что при введении УНВ наблюдается более выраженное полнокровие сосудов и инфильтрацию эритроцитами (рис. 5).

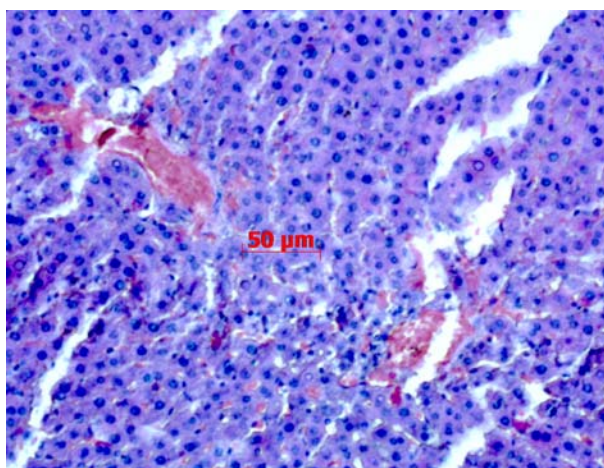


Рис. 5. Гистологическое строение печени у крыс в группе KM2. Отмечается полнокровие и инфильтрация эритроцитами. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 200$

Морфометрические параметры гепатоцитов в контрольной и экспериментальной группе «Куликовской» приводится в табл. 5.

Таблица 5

Морфометрические параметры гепатоцитов в экспериментальных группах животных, мкм

группа	длина ядра	ширина ядра	площадь ядра	длина клетки	ширина клетки	площадь клетки
Контроль	6,23 \pm 0,56	5,67 \pm 0,52	26,73 \pm 4,07	15,9 \pm 1,47	13,3 \pm 1,73	150,56 \pm 22,1
KM2	6,59 \pm 0,57	5,89 \pm 0,4	29,13 \pm 3,78	15,32 \pm 1,05	13,29 \pm 1,02	145,59 \pm 12,9
БР	6,61 \pm 0,63	5,85 \pm 0,72	28,89 \pm 5,48	15,75 \pm 1,3	13,48 \pm 2,13	148,68 \pm 17,71
ОБР	6,45 \pm 0,39	5,83 \pm 0,4	28,5 \pm 3,4	15,1 \pm 1,36	12,84 \pm 1,36	139,74 \pm 21,86

Как можно видеть по нашим результатам разные виды УНВ оказывают выраженного влияния на гистологическое строение органов пищеварения при пероральном введении.

Так, подслизистая и серозная оболочка желудка, гладкая мускулатура во всех группах без патологических изменений. Но в слизистой оболочке всех экспериментальных групп (KM2, 56-БР и 56-ОБР) наблюдается утолщение по отношению к группе «Контроль».

В кишечнике крыс всех экспериментальных групп наблюдается множество бокаловидных клеток с вакуолями, заполненными слизью (рис. 3а и 3б), и как следствие, выраженное слизиобразование, сосуды полнокровны, что является следствием механического раздражения нановолокнами.

Ткань печени отреагировала менее выражено – можно лишь отметить, что при введении УНВ наблюдается более выраженное полнокровие сосудов и инфильтрацию эритроцитами.

Есть также реакция иммунной системы – при введении УНВ 56-БР и 56-ОБР в подслизистом слое отмечается гипертрофия лимфоидных фолликул.

Выраженное токсическое свойство, связанное по-видимому, как и другие обнаруженные эффекты, с механическим повреждением ткани и заключается в дистрофических изменениях и некрозах слизистой в группе KM2. Возможно это связано с меньшим размером УНВ, возникающем при размоле и высокой площадью поверхности агрегатов (до 8983,11 см²/см³).

В целом, наши результаты созвучны данным других исследователей. В работе [12, 13] изучали зависимость токсичности нанотрубок и нановолокон от соотношения длина/диаметр и наличия различных функциональных групп на их поверхности. Токсичность многослойных нанотрубок оказалась ниже токсичности нановолокон, причем токсичность нанотрубок возрастает с увеличением отношения длина/диаметр.

Несомненно, что данная работе требует дальнейшего изучения ввиду высокой важности технологического процесса получения перспективных наноматериалов.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ для молодых докторов наук (МД-7737.2016.5).

Литература

1. Андреев Г.Б., Минашкин В.М., Невский И.А., Путилов А.В. Материалы, производимые по нанотехнологиям: потенциальный риск при получении и использовании // Российский химический журнал. 2008. Т. 52, № 5. С. 32–38.
2. Дриаева М.Д., Сыпченко А.Я., Туктамышев И.Ш., Удина Н.В., Хадарцев А.А. Изучение влияния свойств шунгита на микроорганизмы // Вестник новых медицинских технологий. 2003. №4. С. 60–61.
3. Кричевский Г.Е. Нано-, био-, химические технологии и производство нового поколения волокон, текстиля и одежды. М.: «Известия», 2011. 528 с.
4. Митрофанов И.В., Туктамышев И.Ш. Шунгиты в стоматологии // Вестник новых медицинских технологий. 2003. №4. С. 55.
5. Морозов В.Н., Натарева Э.В., Платонов В.В., Руднева Н.А., Туктамышев И.И., Туктамышев И.Ш., Яшин А.А. Возможности шунгита в кондиционировании питьевой воды и лечении заболеваний кожи // Вестник новых медицинских технологий. 2004. №4. С. 71–73.
6. Хадарцев А.А., Туктамышев И.И., Туктамышев И.Ш. Шунгиты в медицинских технологиях // Вестник новых медицинских технологий. 2002. №2. С. 83.
7. Delorme M.P., Muro Y., Arai T., Banas D.A., Frame S.R., Reed K.L., Warheit D.B. Ninety-day inhalation toxicity study with a vapor grown carbon nanofiber in rats // Toxicol Sci. 2012. Vol. 128, №2. P. 449–460.
8. Feng L., Xie N., Zhong J. Carbon Nanofibers and Their Composites: A Review of Synthesizing, Properties and Applications // Materials. 2014. №7. P. 3919–3945.
9. He C., Nie W., Feng W. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering // Journal of Materials Chemistry B. 2014. Vol. 2, № 45. P. 7828–7848.
10. Horváth L., Magrez A., Schwaller B., Forró L. Toxicity Study of Nanofibers // Supramolecular Structure and Function. 2011. №10. P. 133–149.
11. Huang X. Fabrication and properties of carbon fibers // Materials. 2009. №2. P. 2369–2403.
12. Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J.W., Celio M., Catsicas S., Schwaller B., Forro L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials // Nano Lett. 2006. № 6. P. 1121–1125.
13. Murray A.R., Kisin E.R., Tkach A.V., Yanamala N., Mercer R., Young S.H., Fadeel B., Kagan V.E., Shvedova A.A. Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos // Part. Fibre. Toxicol. 2012. №9. P. 10.

References

1. Andreev GB, Minashkin VM, Nevskiy IA, Putilov AV. Materialy, proizvodimye po nanotekhnologiyam: potentsial'nyy risk pri poluchenii i ispol'zovanii [The materials produced by nanotechnology: a potential risk in obtaining and using]. Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal. 2008;52(5):32-8. Russian.
2. Driaeva MD, Sypchenko AY, Tuktamyshev ISh, Uдина NV, Khadartsev AA. Izuchenie vliyaniya svoystv shungita na mikroorganizmy [The study of the properties of shungite effect on microorganisms]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2003;4:60-1. Russian.
3. Krichevskiy GE. Nano-, bio-, khimicheskie tekhnologii i proizvodstvo novogo pokoleniya volokon, tekstilya i odezhd [Nano-, bio- and chemical technologies and production of a new generation of fibers, textiles and clothing.]. Moscow: «Izvestiya»; 2011. Russian.
4. Mitrofanov IV, Tuktamyshev IS. Shungity v stomatologii [Shungites in dentistry]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2003;4:55. Russian.
5. Morozov VN, Natarova EV, Platonov VV, Rudneva NA, Tuktamyshev II, Tuktamyshev IS, Yashin AA. Vozmozhnosti shungita v konditsionirovanii pit'evoy vody i lechenii zabolevaniy kozhi [Features shungite in air-conditioning drinking water and the treatment of skin diseases]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2004;4:71-3. Russian.
6. Khadartsev AA, Tuktamyshev II, Tuktamyshev IS. Shungity v meditsinskikh tekhnologiyakh [Shungites in medical technology]. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2002;2:83. Russian.
7. Delorme MP, Muro Y, Arai T, Banas DA, Frame SR, Reed KL, Warheit DB. Ninety-day inhalation toxicity study with a vapor grown carbon nanofiber in rats. Toxicol Sci. 2012;128(2):449-60.
8. Feng L, Xie N, Zhong J. Carbon Nanofibers and Their Composites: A Review of Synthesizing, Properties and Applications. Materials. 2014;7:3919-45.
9. He C, Nie W, Feng W. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering. Journal of Materials Chemistry B. 2014;2(45):7828-48.
10. Horváth L, Magrez A, Schwaller B, Forró L. Toxicity Study of Nanofibers. Supramolecular Structure and Function. 2011;10:133-49.
11. Huang X. Fabrication and properties of carbon fibers. Materials. 2009;2:2369-403.

12. Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forro L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.* 2006;6:1121-5.

13. Murray AR, Kisin ER, Tkach AV, Yanamala N, Mercer R, Young SH, Fadeel B, Kagan VE, Shvedova AA. Factoring-in agglomeration of carbon nanotubes and nanofibers for better prediction of their toxicity versus asbestos. *Part. Fibre. Toxicol.* 2012;9:10.

Библиографическая ссылка:

Чайка В.В., Сергиевич А.А., Саяпина Н.В., Баталова Т.А., Мишаков И.В., Ведягин А.А., Голохваст К.С. Морфологическая оценка влияния трёх типов углеродных нановолокон на органы пищеварения крыс линии вистар при пероральном введении // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №4. Публикация 2-1. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-4/2-1.pdf> (дата обращения: 03.10.2016). DOI: 10.12737/21853.