

УДК 57.043, 57.044, 611.013

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА УГЛЕРОДНОГО НАНОСТРУКТУРНОГО МАТЕРИАЛА – ПЕРСПЕКТИВНОГО НОСИТЕЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШАХ¹

**А. А. Гусев¹ И. А. Полякова¹
Е. Б. Горшенева¹ А. Г. Ткачев²
А. В. Емельянов¹ С. В. Шутова¹
О. Н. Зайцева¹ А. В. Федоров³
Т. В. Васильева³**

¹Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Россия, 392000, г. Тамбов, ул. Интернациональная, 33
E-mail: nanosecurity@mail.ru

²Тамбовский государственный технический университет, Россия, 392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12, МГУ

Проведено исследование влияния промышленно производимого углеродного наноструктурного материала (многостенных углеродных нанотрубок) на репродуктивную деятельность нелинейных лабораторных мышей. Установлено, что перорально вводимый коллоидный водный раствор наноматериала в среднесуточной дозировке 30 мг/кг массы тела приводит к бесплодию у самцов мышей, однако не вызывает негативных изменений репродуктивной функции у самок.

Ключевые слова: многостенные углеродные нанотрубки, нанотоксикология, репродуктивная токсичность.

Введение

Открытые в 1991 году, углеродные нанотрубки быстро завоевали статус одного из самых перспективных материалов будущего. Среди реальных и потенциальных сфер их применения – микроэлектроника, микромеханика, энергетика, экология, сельское хозяйство и т.д. Особенно стоит остановиться на медицинских приложениях – здесь углеродные нанотрубки, за счет своих уникальных физико-химических свойств, таких, как высокая прочность, гидрофобность, химическая инертность, высокая проникающая способность, становятся идеальными носителями для доставки лекарственных веществ, обеспечивающими адресность, сохранность активных компонентов во внутренней среде организма, пролонгированность действия [1]. В то же время, вопрос токсичности углеродных нанотрубок является предметом продолжающихся дебатов [2]. Имеется ряд работ, демонстрирующих негативное воздействие этих структур на живые организмы [3, 4, 5]. В большинстве известных исследований на млекопитающих наноматериалы вводились аэрозольно. В то же время, наряду с респираторным и перкутантным путями, алиментарное поступление наноматериалов в организм представляется наиболее вероятным [6]. Кроме того, недостаточно изучены вопросы репродуктивной токсичности углеродных нанотрубок. Поэтому целью данного исследования явилась оценка реакции репродуктивной системы на углеродный наноструктурный материал «Таунит» (УНМ «Таунит», многослойные углеродные нанотрубки), вводимый перорально лабораторным мышам.

Объекты и методы исследования

Объект исследования – углеродный наноматериал «Таунит» (УНМ «Таунит», многостенные углеродные нанотрубки), производимый в промышленных масштабах

¹ НИР проведена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (госконтракт № П 208 от 23.04.2010 г.)



ООО «НаноТехЦентр» (г. Тамбов). Данный материал представляет собой одномерные, наномасштабные, нитевидные образования поликристаллического графита, цилиндрической формы с внутренним каналом, в виде сыпучего порошка черного цвета. Гидрофобен, химически инертен, чистота – более 98%. Гранулы УНМ микрометрических размеров имеют структуру спутанных пучков многостенных трубок (рис. 1), способ получения – газофазное химическое осаждение на металлическом катализаторе (ГФХО) или CDC-процесс. «Таунит» является перспективным материалом для авиационной, атомной, космической промышленности, медицины, фармацевтики, для производства суперкомпьютеров, видеотехники, плоских экранов, мониторов, фильтров широкого назначения. Добавка УНМ «Таунит» улучшает качество смазок, конструкционных композитов, строительных материалов. Гранулы «Таунита» могут служить носителями катализаторов или лекарственных препаратов, также в качестве адсорбентов, источников холодной эмиссии электронов [7].

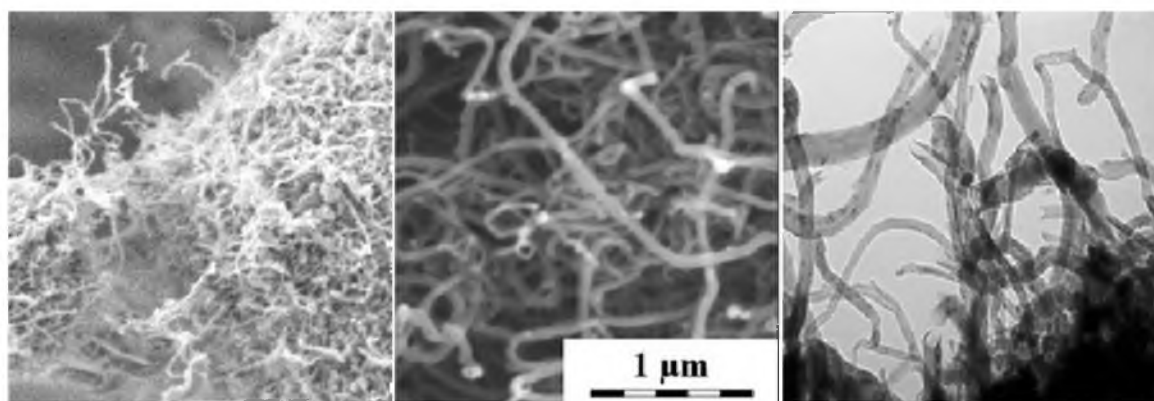


Рис. 1. Электронные микрофотографии углеродного наноструктурного материала «Таунит». Фотографии предоставлены ООО «НаноТехЦентр», г. Тамбов

Эксперимент состоял из двух частей: в первом случае проводилась оценка физиологического эффекта исследуемого наноматериала на самцов, во втором – на самок лабораторной мыши.

1. Для исследования воздействия наноматериала на мужскую репродуктивную функцию формировались две одновозрастные группы животных (экспериментальная и контрольная группы), состоящие из 10 половозрелых нелинейных самцов лабораторной мыши каждая. На протяжении всего эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (ГОСТ Р 50258-92). Карантин составлял 10 дней.

В течение 30 дней экспериментальной группе перорально вводился УНМ «Таунит» путем замены питьевой воды на коллоидный водный раствор. Раствор готовился на дистиллированной воде с использованием ультразвуковой установки. Среднесуточная доза исследуемого материала на каждого самца в экспериментальной группе составляла 30 мг/кг. Оценивалось общее состояние животных.

Контрольную группу составляли мыши, которым вводили дистиллированную воду в аналогичных количествах.

По истечении срока экспозиции к каждому самцу подсаживалось по 3 виргинных неэкспонированных самок. Отмечалось наличие полового поведения. Подсадка самок к подопытным самцам производилась еженедельно на протяжении трех недель. Отсаженных самок вскрывали через 15-17 дней. Оценивалось количество беременных самок, самок с живыми плодами, с мертвыми плодами; количество живых и мертвых плодов на помет.

2. Для оценки действия наноматериала на репродуктивную функцию самок формировались две одновозрастные группы животных (экспериментальная и контрольная группы), состоящие из 10 половозрелых нелинейных самок лабораторной мыши каждая. На протяжении всего эксперимента все животные содержались в стандартных условиях (ГОСТ Р 50258-92). Карантин составлял 10 дней.

Коллоидный водный раствор наноматериала для поения животных готовился аналогично предыдущему.

После нескольких дней совместного содержания с половозрелыми неэкспонированными самцами, самок отсаживали в отдельные клетки и с этого момента переходили на поение тестируемой жидкостью. Эксперимент завершался после окончания молочного вскармливания потомства.

Оценивали следующие показатели: % гибели самок (общий и за каждый день эксперимента); % гибели молодняка в течение первых трех дней жизни; % не родивших самок; число эмбрионов у погибшей самки; плодовитость; общее состояние самок.

На каждом этапе помимо экспериментальной группы, содержалась и аналогичным образом изучалась контрольная группа мышей, для поения которой использовалась дистиллированная вода.

Результаты и их обсуждение

1. Согласно методике исследования, к самцам из экспериментальной и контрольной групп в течение 3-х недель подсаживались неэкспонированные виргинные самки репродуктивного возраста. В обеих группах было зарегистрировано наличие нормального полового поведения. Внешних патологических изменений в экспериментальной группе отмечено не было. Последующее наблюдение за самками позволило установить, что углеродный наноматериал, вводимый перорально в исследуемой дозировке, вызывает полную стерильность самцов лабораторной мыши (рис. 2).

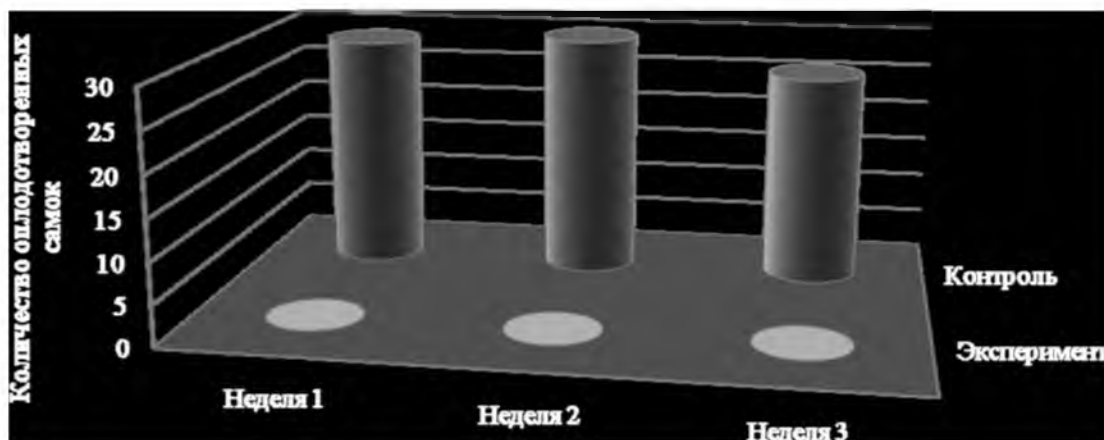


Рис. 2. Количество успешно оплодотворенных самок в течение эксперимента

Исследование гистологических срезов семенников экспериментальных животных показало значительные структурные нарушения по сравнению с контрольной группой (рис. 3). Полученный результат может свидетельствовать о том, что наряду с такими органами, как печень, селезенка и легкие семенники являются органами-мишенями для наночастиц.

Возможным механизмом токсического эффекта углеродных нанотрубок является окислительный стресс. Углеродные нанотрубки имеют цилиндрическую форму. Присутствие в ткани достаточно длинных и жестких (многослойных) нанотрубок вызывает «сбой» в поведении макрофагов [8]. Эти клетки оказываются неспособными «проглотить» такую большую частицу и лишь выбрасывают в среду токсичные формы кислорода (АФК) и гидролитические ферменты, вызывая воспалительную реакцию [8]. Окислительный стресс может явиться причиной инфертильности мужских особей. Гиперпродукция активных форм кислорода приводит к снижению жизнеспособности клеток в эякуляте, что приводит к неспособности к оплодотворению [9].

В ходе интоксикации наноматериалом возможно возникновение хромосомных аббераций. Большинство их возникает в хромосомах, получаемых от отца [10]. Воз-



можно, именно такие нарушения имели место в ходе эксперимента, что в конечном итоге привело к нежизнеспособности или сниженной жизнеспособности сперматозоидов, либо вызвало нарушения сперматогенной ткани, что воспрепятствовало нормальному образованию половых клеток. В результате самцы из обеих экспериментальных групп могли потерять способность к оплодотворению.

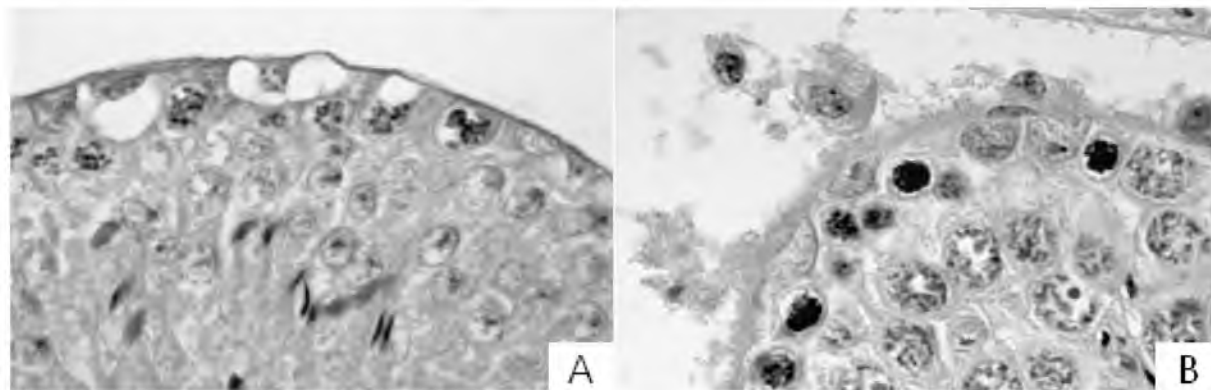


Рис. 3. Гистологические срезы семенников мышей из контрольной (А) и экспериментальной (В) групп. На правом изображении видны нарушение структуры семенного канальца и многочисленные некрозы клеток. Фотографии сделаны сотрудниками Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством профессора кафедры клеточной биологии и гистологии, д. б. н. Г.Е. Онищенко

Стресс, возникший в результате механического повреждения или отравления наноматериалом, может сопровождаться повышением уровня стрессорных гормонов – кортикостероидов, катехоламинов. Гормональные сдвиги, сопровождающие стресс, способны вызывать патологические или адаптивные изменения на уровне ЦНС, в частности в гипоталамусе, в результате чего возможны нарушения секреции в нем гормона гонадолиберина, при этом снижается выделение лютеинизирующего гормона, действующего на находящиеся в семенниках клетки Лейдига, которые в ответ выделяют гормон тестостерон. Это впоследствии может обусловить дисфункцию репродуктивной системы [11]. Таким образом, нарушение гормонального баланса под воздействием наноматериала могло привести к угнетению репродуктивной функции на уровне гуморальной регуляции сперматогенеза.

2. Для исследования влияния наноматериала на женскую репродуктивную функцию, после совместного содержания с половозрелыми неэкспонированными самцами, самок в течение беременности и молочного вскармливания поили тестируемой жидкостью. Патологических отклонений во внешнем виде и поведении экспериментальных самок зарегистрировано не было, напротив, они более интенсивно набирали массу тела, чем самки контрольной группы.

Позитивная тенденция наблюдалась и при анализе исследованных показателей репродуктивной деятельности. Было установлено, что при воздействии на организм УНМ «Таунит», вводимого перорально в исследуемой дозировке происходит повышение плодовитости самок на 30 %, снижение смертности молодняка на 46 %, а также уменьшение доли не родивших особей на 17 % (рис. 4).

Подобный эффект можно объяснить следующим образом. Различные реакции на одно и то же воздействие в первом и втором экспериментах возможно связаны с особенностями физиологии мужского и женского организмов, которые выражаются в неодинаковых нормах реакции, характерных для каждого из полов [12]. Например, описанное выше возможное нарушение гормонального баланса в мужском организме может вызывать сперматоксический эффект, в то время как в женском организме подобная гормональная картина может стимулировать деятельность репродуктивной системы. Так или иначе, механизмы наблюдаемых нами изменений требуют более глубокого исследования.

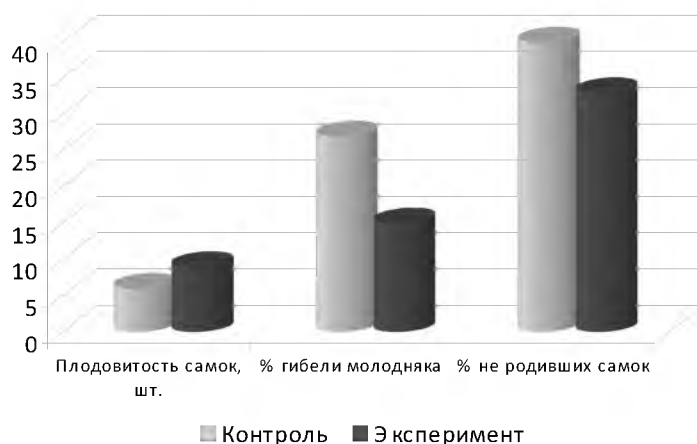


Рис. 4. Сопоставление среднегрупповых показателей плодовитости самок, доли погибшего молодняка, доли не родивших самок мышей в контрольной и экспериментальной группах

Заключение

Таким образом, проведено исследование влияние промышленно-производимого углеродного наноструктурного материала на репродуктивные функции лабораторных мышей. Показано, что пероральное введение коллоидного водного раствора углеродного наноматериала «Таунит» в дозировке 30 мг/кг массы тела является причиной бесплодия у самцов мышей. В тоже время, исследуемая дозировка наноматериала стимулирует повышение плодовитости у самок, приводит к снижению смертности молодняка, а также уменьшению доли не родивших особей.

Полученные результаты могут быть учтены при разработке норм содержания углеродных наноматериалов в средах, контактирующих с животными и человеком, а также при создании на основе многостенных углеродных нанотрубок лекарственных препаратов нового поколения.

Список литературы

1. Фостер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации, возможности. – М.: Техносфера, 2008. – 352 с.
2. Zhao Yuliang, Xing Genmei, Chai Zhifang. Are carbon nanotubes safe? // Nature Nanotechnology. – 2008. – №4. – P. 191-192.
3. Kostarelos K. The long and short of carbon nanotube toxicity // Nature Biotechnology. – 2008. - №7. Vol. 26. – P. 774-776.
4. Miyawaki J., Yudasaka M., Azami T. et al. Toxicity of Single-Walled Carbon Nanohorns // Acsnano. – 2008. – Vol. 2, № 2. – P. 213–226.
5. Poland C. A., Duffin R., Kinloch I. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestoslike pathogenicity in a pilot study // Nature Nanotechnology. – 2008. Vol. 3. – P. 423-428.
6. Онищенко Г.Г. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. №79 Москва «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» [Электронный ресурс]. URL: <http://www.rospotrebnadzor.ru/documents/postanov/1344/> (дата обращения: 12.02.2010).
7. Ткачев А.Г., Золотухин И.В. Аппаратура и методы синтеза твердотельных наноструктур: монография / – М.: "Издательство Машиностроение-1", 2007. – 316 с.



8. Насибуллаев Ш.К. Фуллерены, их производные и нанотрубки [Электронный ресурс]. URL: <http://originweb.info/education/chemistry/fullerenes6.html> (дата обращения: 22.02.2010).

9. Быкова М.В. Нарушение редокс-баланса сперматозоидов и семенной плазмы мужчин при патоспермии. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Красноярск, 2008.

10. Уйба В.В. Разработка медико - биологического обеспечения безопасности в области нанотехнологий [Электронный ресурс]. URL:

http://rusnanotech08.rusnanoforum.ru/sadm_files/disk/Docs/1/7/14.pdf (дата обращения: 10.03.2010).

11. Кэттайл В.М., Арки Р. А. Патология эндокринной системы. пер. с англ. – СПб. – М.: «Невский диалект» – «Издательство БИНОМ», 2001. – 336 с.

12. Геодакян В.А. Дифференциальная смертность и норма реакции мужского и женского пола. Журн. общ. биологии. – 1974. – Vol.35, № 3. – С. 376–385.

SEXUAL DIFFERENCE OF THE PHYSIOLOGICAL EFFECT OF CARBON NANOSTRUCTURAL MATERIAL – A PERSPECTIVE CARRIER OF MEDICATION IN EXPERIMENT ON LABORATORY MOUSE

**A. A. Gusev¹ I. A. Polyakova¹
E. B. Gorsheneva¹ A. G. Tkachev²
A. V. Emel'yanov¹ S. V. Shutova¹
O. N. Zayceva¹ A. V. Fedorov³
T. V. Vasilieva³**

¹Tambov State University after G.R. Derzhavin, Internacionalinaya St., 33, Tambov, 392000, Russia,
E-mail: nanosecurity@mail.ru

²Tambov State Technical University, Sovietskaya St., 106 Tambov, 392000, Russia

³Moscow State University of the after M.V. Lomonosov, Biological faculty, Leniniskie gory, 1/12, Moscow, 119991, Russia

This article shows the results of the conducted investigation of the carbon nanomaterial (produced industrially multiwalled carbon nanotubes) influence on the nonlinear laboratory mice's reproductive activity. It is determined that nanomaterial colloid (daily dose 30 mg/kg to body mass) causes the male barrenness whereas there is no negative changes in the female reproductive function.

Key words: multiwalled carbon nanotubes, nanotoxicology, reproductive toxicity.