

**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. GOLOKHVAST\*

\* *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/см<sup>2</sup>.

**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 (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) на гетерогенном катализаторе 90%NiO+10%Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 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 <sup>2</sup> /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).

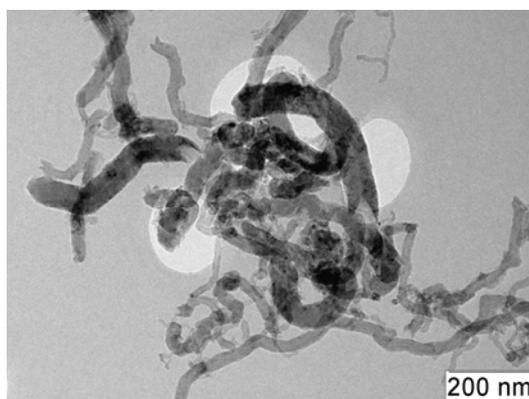


Рис. 1. Агрегат углеродных нановолокон БР-56. Электронная трансмиссионная микроскопия. Измерительный отрезок 200 нм

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.

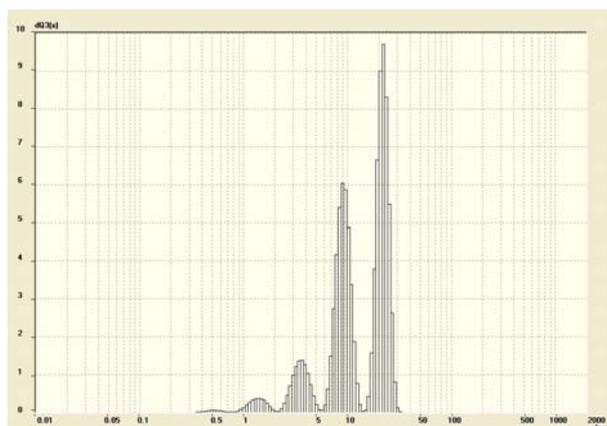


Рис. 2. Распределение агрегатов УНВ 56-БР по размеру и их доля (%) в типовом образце

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 <sup>2</sup> /см <sup>3</sup>
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.

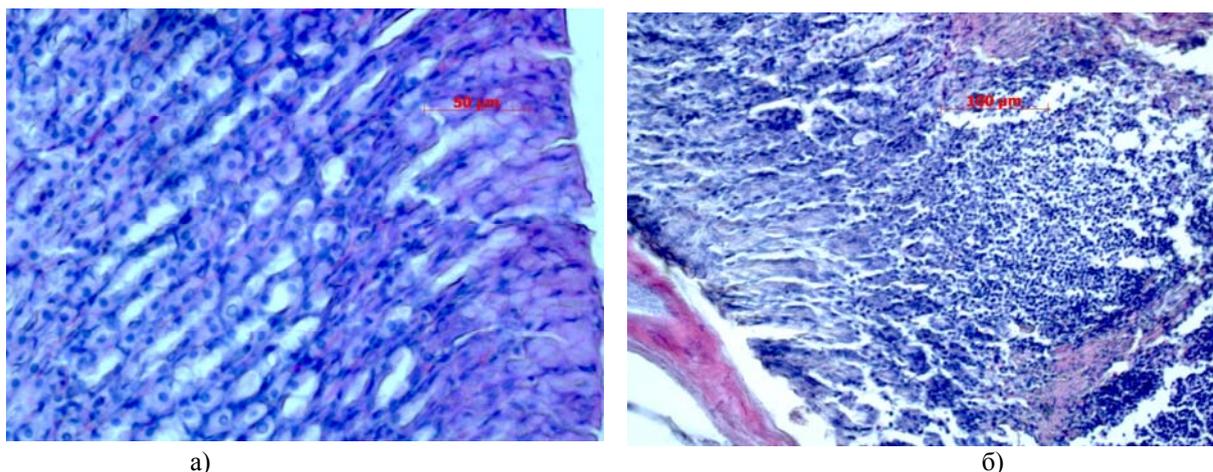


Рис. 3. Гистологическое строение желудка у крыс при введении УНВ разных типов. а) Желудок крысы в группе КМ2. Поверхностный слой слизистой желудка отсутствуют ядра, граница клеток стерта. Окраска гематоксилин-эозином. б) Желудок крысы в группе 56-ОБР. Крупный лимфоидный фолликул. Окраска гематоксилин-эозином.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

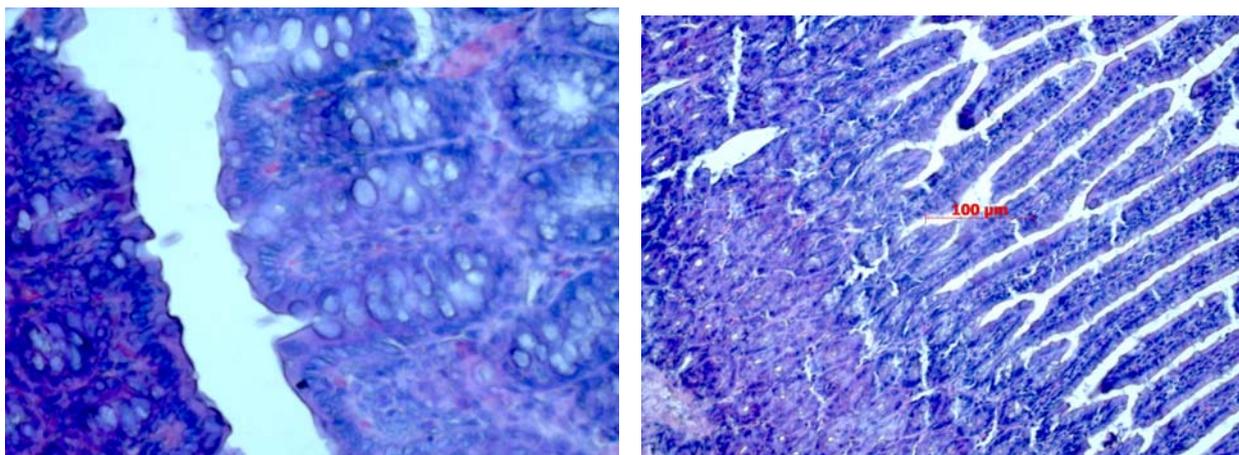
Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах приводится в табл. 3.

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).

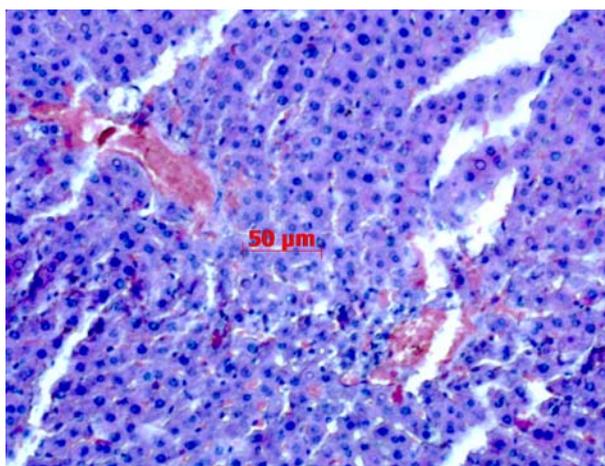


Рис. 5. Гистологическое строение печени у крыс в группе KM2. Отмечается полнокровие и инфильтрация эритроцитами. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200$

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±0,56	5,67±0,52	26,73±4,07	15,9±1,47	13,3±1,73	150,56±22,1
KM2	6,59±0,57	5,89±0,4	29,13±3,78	15,32±1,05	13,29±1,02	145,59±12,9
БР	6,61±0,63	5,85±0,72	28,89±5,48	15,75±1,3	13,48±2,13	148,68±17,71
ОБР	6,45±0,39	5,83±0,4	28,5±3,4	15,1±1,36	12,84±1,36	139,74±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  $8983,11 \text{ см}^2/\text{см}^3$ ).

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.