Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Саяпина Нина Витальевна

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ КАК ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

03.02.08 – экология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Голохваст К.С.

Якутск 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10
1.1 Общая характеристика наноматериалов и области их применения 10
1.2 Влияние углеродных наноматериалов на окружающую среду ... 16
1.3 Влияние углеродных наноматериалов на состояние живых организмов 18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 40
2.1 Физико-химическая характеристика УНМ 40
2.2 Описание условий проведения экспериментального исследования УНМ 45
2.3 Характеристика физиологических методов оценки поведения УНМ 46
2.3.1 Тест «открытое поле» 46
2.3.2 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» 48
2.3.3 Универсальная проблемная камера Н.Р. Григорьева 49
2.4 Характеристика методов определения биохимических показателей крови 51
2.5 Характеристика морфологических методов исследования 52
2.6 Характеристика математических методов анализа полученных данных 52
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И «ПОВЕДЕНИЯ» НАНОМАТЕРИАЛОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ, А ТАКЖЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ 54
3.1 Раман-спектроскопия УНМ 54
3.2 Поведение УНВ в водопроводной воде 58
3.2.1 Углеродные нановолокна (УНВ) 58
3.3 Исследование осаждения УНМ 60
3.3.1 Исследование осаждения МУНТ 60

3.3.2 Исследование осаждения УНВ 62
3.4 Морфологические изменения в организме крыс, вызванные наноматериалами 64
3.4.1 Морфологическая оценка влияния углеродных нановолокон на органы пищеварения и ткани головного мозга крыс при пероральном введении 64
3.5 Исследование влияния углеродных наноматериалов на поведенческие показатели 71
3.5.1 Исследование влияния углеродных нанотрубок 71
3.5.2 Исследование влияния углеродных нановолокон 84
3.6 Исследование биохимических показателей крови при воздействии УНМ 100
ВЫВОДЫ 105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Наноматериалы – искусственные материалы, которые созданы с использованием нанотехнологий или содержащие в своем составе наночастицы (имеющие в одном из своих измерений размеры менее 100 нм). Обычно такие материалы обладают одним или несколькими уникальными свойствами.

В настоящее время в сфере современных технологий наноматериалы находят широкое применение. Одновременно со стремительным развитием нанотехнологий учеными ставится вопрос о токсичности наноматериалов. В связи с этим в начале 2000-х гг. появилась новая наука – нанотоксикология – наука о воздействии наноматериалов и наночастиц на живой организм.

Бурный рост производства и применения наноматериалов может повлечь возникновение непредвиденных экологических катастроф, вызванных попаданием новых материалов, например многослойных углеродных нанотрубок, в частности, в водные системы, с дальнейшим воздействием на живые организмы (Бородкин, 2011). Именно поэтому проведение исследования «поведения» наноматериалов в окружающей среде, по мнению ряда ученых, сейчас является наиболее государственно-значимой задачей, напрямую связанной с проблемой биологической безопасности страны (Супотницкий и др., 2009; Lopes et al., 2016; McGillicuddy et al., 2017). Большинство этих работ касаются наночастиц металлов, а вопрос поведения углеродных наноматериалов в окружающей среде, в том числе и в водных ресурсах, остается нераскрытым.

В Российской Федерации не разработаны ГОСТы или СанПиН, устанавливающий предельно допустимые концентрации наночастиц (Абаева и др., 2010), лишь ГН 1.2.2633-10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды» (ГН 1.2.2633-10), утвержденные в 2010 году, действуют на территории страны. Но они лишь частично касаются проблем влияния наночастиц на окружающую среду и нормируют только содержание наночастиц диоксида титана, серебра и

одностенных углеродных нанотрубок (ОСУНТ). Очевидно, что этот список должен быть дополнен многослойными углеродными нанотрубками, углеродными нановолокнами (УНВ).

Современная индустриализация производства, появление нанотехнологий в том числе, требует разработки передового оборудования и технологий для очистки и получения питьевых характеристик воды (Войтов, Сколубович, 2013). В настоящее время проблема загрязнения природных вод носит глобальный характер (Тутурова, 2016). Основными мишенями при химическом загрязнении вод становятся гидробионты, а также высшие типы животных и человек, которые находятся на высших уровнях пищевой пирамиды (Гвоздовский, 2016; Тутурова, 2016). По мнению исследователей, несмотря на соответствие качества водопроводной воды санитарным нормам, население испытывает соматические проблемы при использовании ее в бытовой жизни (Гвоздовский, 2016).

Большинство ученых сходится во мнении, что углеродные наноматериалы обладают токсическим эффектом, – вследствие усиления образования активных форм кислорода, они могут порождать апоптоз клеток и проявлять мутагенные свойства (Yanamala et al., 2013; Costa, Fadeel, 2016). Учитывая тот факт, что такие наночастицы способны легко преодолевать защитные барьеры организма и оказывать негативное влияние на генетический материал, вопрос отсроченного их влияния пока остается открытым (Engin et al., 2015; Piperigkou et al., 2016) и требует своего разрешения.

Степень разработанности. На сегодняшний день остро стоит вопрос об экологической угрозе при попадании УНМ в окружающую среду, в частности, в водной среде УНМ могут представлять собой не менее серьезную экологическую проблему. Одним из важнейших результатов диссертационной работы является выявление способности всех типов УНМ находиться в окружающей среде в виде агрегатов. Впервые показано влияние УНМ на поведенческие характеристики и описаны возможные механизмы воздействия через ЖКТ на высшую нервную деятельность (ВНД).

Цель и задачи работы: дать эколого-биологическую оценку углеродным наноматериалам как загрязняющим веществам антропогенного происхождения.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать химическую структуру и «поведение» углеродных наноматериалов (УНМ) в окружающей среде (на примере водной среды) и дать экологическую оценку.

2. Оценить морфологические изменения при воздействии углеродных нановолокон на организм животных при пероральном введении.

3. Исследовать биохимические показатели крови у крыс при пероральном употреблении углеродных наноматериалов.

4. Изучить в динамике изменения показателей высшей нервной деятельности у животных на фоне воздействия углеродных наноматериалов как экологического фактора при пероральном введении.

Научная новизна исследования. Впервые показано, что углеродные наноматериалы (УНМ) в воде являются длительно персистирующими токсикантами.

Углеродные наноматериалы в воде находятся не в виде единичных структур, а в виде агрегатов во взвешенном состоянии 24 часа. Впервые показано, что при воздействии течения (в эксперименте с использованием ультразвукового диспергирования) агрегаты углеродных нановолокон увеличиваются в размерах. Впервые показано, что углеродные нановолокна, как тип загрязняющих веществ, при краткосрочном введении крысам в виде агрегатов вызывают стойкие морфофункциональные отклонения в органах желужочно-кишечного тракта и, как следствие, снижают адаптивные возможности животных. В частности, показано, что органы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) повреждаются механическими свойствами всех исследованных углеродных нановолокон, что проявляется вакуолизацией, некрозом.

Нами не было выявлено выраженной реакции перекисного окисления липидов при введении углеродных нанотрубок в исследованной концентрации (500 мг/кг массы животного) и экспозиции до 10 дней.

Впервые исследована реакция ткани головного мозга крыс на введение углеродных наноматериалов. Обнаружено, что все эффекты носят физиологический характер.

Впервые изучено и проанализировано влияние загрязняющих веществ на сроках экспозиции 3 и 10 дней на компоненты врожденного и приобретенного поведения у крыс. В частности, показано, что углеродные наноматериалы способны снижать показатели исследовательской и поисковой активности (ИА и ПА) у крыс и увеличивать их тревожность.

Углеродные нановолокна повышают биохимические маркеры воспаления интерлейкин-10 (ИЛ-10) и интерлейкин-6 (ИЛ-6) у крыс при пероральном применении.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе данные о поведении УНМ в водной среде и их токсичности должны учитываться при проектировании заводов по производству наноматериалов и их нахождению по отношению к водным объектам.

Полученные экспериментальные данные о динамике изменения показателей поведения в связи с воздействием углеродных наноматериалов расширяют имеющиеся представления о токсическом действии последних на поведенческом, биохимическом, морфологическом уровнях.

Сведения, полученные в ходе эксперимента об особенностях изменения различного рода активности на фоне перорального употребления углеродных наноматериалов, имеют практическую значимость для экологических, биомедицинских дисциплин, а также профилактической медицины.

Опубликованные материалы могут быть использованы и в учебном процессе, и в научных исследованиях как в Дальневосточном федеральном университете (ДФУ), Амурской государственной медицинской академии (АГМА), так и ряде академических и отраслевых научно-исследовательских институтов (НИИ) Сибири и Дальнего Востока.

Методология и методы диссертационного исследования. В ходе работы использованы современные методы физико-химических, гистологических и

поведенческих исследований. С последующей статистической обработкой и интерпретацией.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Углеродные наноматериалы при попадании в воду образуют устойчивые агрегаты (АгУНМ), которые 24 часа могут находиться во взвешенном состоянии и в течение недели стремятся к осаждению. При имитации естественного течения перемешиванием ультразвуком (от 10 до 100 Вт) агрегаты углеродных нановолокон (АгУНВ) увеличиваются в размере.

2. Агрегаты углеродных наноматериалов (АгУНМ) при краткосрочном пероральном введении в организм животных вызывают морфофункциональные изменения в органах желудочно-кишечного тракта, вызывая повреждения и нарушение функции (воспаление, единичный некроз, повышают уровень ИЛ-6 и ИЛ-10) эпителия органов желудочно-кишечного тракта, чем снижают адаптивные возможности животных, проявляющиеся в поведенческих характеристиках.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности полученных результатов выражается в комплексном подходе с применением научных методов для оценки объекта и предмета исследования с использованием статистической обработки полученных данных. Выводы отражены наглядно – с помощью рисунков и таблиц диссертации.

Результаты исследований и основные положения диссертационной работы представлялись и обсуждались:

– на Sixteen International Conference on the Science and Application of Nanotubes (28.06–3.07.2015, Nagoya, Japan);

– 68-й Итоговой студенческой научной конференции АГМА (18–28 апреля 2016 г., Благовещенск, РФ);

Личный вклад автора. Автор принимал участие в исследованиях, осуществляемых физико-химическими и гистологическими методами работы. Самостоятельно провел эксперименты по исследованию влияния наноматериалов на лабораторных животных, выполнил физиологические исследования, проанализировал и интерпретировал полученные данные. Автор принимал

непосредственное участие в подготовке всех опубликованных по материалам диссертации статей и тезисов докладов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 3 статьи – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи – в зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах. Содержит введение, 3 главы, выводы, список сокращений и условных обозначений, а также список литературы. Последний включает 146 источников, в том числе, 77 иностранных. Диссертация иллюстрирована 24 таблицами и 24 рисунками.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых докторов наук МД-7737.2015.6.

Благодарности. Выражаю благодарность моему научному руководителю д.б.н. К.С. Голохвасту, а также д.б.н. Т.А. Баталовой за поддержку на всех этапах становления моего научного мировоззрения и всестороннюю поддержку в процессе работы над диссертацией.

Также выражаю благодарность за сотрудничество заведующей кафедрой экологии Школы естественных наук ДВФУ к.б.н. Ю.А. Галышевой, заместителю проректора по научной работе ДВФУ к.б.н. А.А. Сергиевичу, директору НОЦ нанотехнологии ДВФУ к.б.н. В.В. Чайке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика наноматериалов и области их применения

Нанотехнологии получили широкое распространение с конца XX в., и уже сегодня, в XXI в., наноструктуры становятся активными участниками достижений в различных областях науки (Гинзбург и др., 2008; Зиганшин, Зиганшина, 2008; Каркищенко, 2009; Абаева и др., 2010; Арчаков, 2010; Бородкин, 2011; Муртазина, Лефтерова, 2012). Впервые термин «нанотехнологии» применил японский инженер Норио Танигучи в 1974 году. Под этим названием он понимал разделение, изменение, сборку материалов с помощью одного атома или молекулы (Муртазина, Лефтерова, 2012; Мамчиц и др., 2014). Широкое использование данного термина началось только в начале 90-х гг. XX столетия (Мамчиц и др., 2014). В настоящее время популярная приставка «нано-» по большей части не несет никакого смысла, а используется только как модное веяние XXI в. (Евдокимов, 2008). Однако известны данные об исследованиях М. Фарадея в XIX в., изучавшего оптические свойства наночастиц золота и показавшего уже тогда возможность целенаправленного управления ими (Мамчиц и др., 2014).

Сегодня под термином «нанотехнологии» подразумевают технические процессы создания, манипулирования частицами и структурами, наделенными определенными свойствами, где один из размеров составляет от 1 до 100 нм (Гинзбург и др., 2008; Зиганшин, Зиганшина, 2008; Супотницкий и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Арчаков, 2010; Бородкин, 2011; Латышевская, Стрекалова, 2011; Муртазина, Лефтерова, 2012; Подколодная и др., 2012; Мамчиц и др., 2014). Следует отметить, что 1 нм составляет 10^{-9} м, или 10^{-6} мм, или 10^{-3} мкм (Супотницкий и др., 2009).

Наночастицы представляют собой объединение атомом в кластеры. Их особенность в том, что свойства не зависят от количества атомов, как в

типичных молекулах, а определяются удельной площадью активной поверхности, на которой располагаются атомы углерода с неспаренными электронами на свободных орбиталях (Супотницкий и др., 2009). Это и предопределяет высокую химическую и адсорбционную активности и может повлечь присоединение атомов из внешней среды с появлением иных свойств. Имеет значение и приповерхностный слой – число атомов в данном слое в частицах увеличивается с уменьшением размеров (Супотницкий и др., 2009). Другие авторы также подтверждают выраженность сорбционной активности за счет большой площади удельной поверхности (Евдокимов, 2008; Крученецкий и др., 2013).

Несмотря на большое разнообразие наноструктур, углеродные считаются наиболее распространенными и изученными в плане токсикологических свойств (Евдокимов, 2008; Абаева и др., 2010; Гусев и др., 2010б; Фирстова и др., 2011; Голубева, Полищук, 2012; Гусев и др., 2013а). Углерод формирует наноструктуры в виде нанотрубок, нановолокон, фуллеренов (Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Фирстова и др., 2011; Голохваст и др., 2013а). Нанотрубки были открыты в 1991 году. Они имеют вид полых одностенных либо многостенных графитовых цилиндров, длиной в несколько микрон, а в диаметре имеющие наноразмер (Гинзбург и др., 2008; Фатхутдинова и др., 2009; Гусев и др., 2010а; Фирстова и др., 2011; Голубева, Полищук, 2012; Голохваст и др., 2013а; Крученецкий и др., 2013; Castranova et al., 2013). По типу сворачивания выделяют хиральные – спиральные и ахиральные – прямые (Крученецкий и др., 2013). У нановолокон иная химическая структура: слои графена в виде чашек, конусов и пластин. Нановолокна обладают повышенной пластичностью и прочностью (Delorme et. al., 2012; Castranova et al., 2013; Feng et.al.,2014).

Область применения наноматериалов достаточно широка – от различных направлений в физике до биомедицинских наук (Гинзбург и др., 2008; Сейфулла и др., 2008; Каркищенко, 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Гусев и др., 2010б; Добрецов и др., 2010; Бородкин, 2011; Гусев и др., 2013а; Oberdörster et al., 2015).

В подавляющем большинстве литературных источников такое широкое применение связывают с наличием у наноматериалов особых физико-химических свойств, которые приобретаются благодаря их наноразмерам (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Сейфулла и др., 2008; Каркищенко, 2009; Арчаков, 2010; Гусев и др., 2010б; Муртазина, Лефтерова, 2012; Мамчиц и др., 2014; Castranova et al., 2013; Dal Bosco et al., 2015), что и обусловливает повышенный интерес исследователей: даже золото, инертный металл, в наноразмерах становится активным (Абаева и др., 2010). По мнению Ю.М. Евдокимова, важной характеристикой наночастиц является не сам наноразмер, а именно новые приобретаемые свойства при наноразмерах (Евдокимов, 2008).

Д. Чен с соавторами среди уникальных свойств нанотрубок выделяют их повышенную пластичность, прочность, электро- и теплопроводность (Chen et al., 2015). В биомедицинских науках особое значение приобретают: способность наночастиц беспрепятственно проникать в клетки организма за счет встраивания в мембраны; сродство к липидным структурам организма; возможность контакта с макромолекулами белков, полисахаридов; прочность; инертность – эти свойства углеродных наноструктур привлекли внимание ученых биомедицинских наук: с помощью различных нанообъектов предполагается усовершенствовать методы, диагностику и лечение различного рода заболеваний (Гинзбург и др., 2008; Зиганшин, Зиганшина, 2008; Сейфулла и др., 2008; Каркищенко, 2009; Абаева и др., 2010; Арчаков, 2010; Бородкин, 2011; Голубева, Полищук, 2012; Муртазина, Лефтерова, 2012; Подколодная и др., 2012; Мамчиц и др., 2014; Dal Bosco et al., 2015).

Существуют гипотезы, что с помощью нанотехнологий возможно не только решить проблему многих заболеваний и увеличить продолжительность и качество жизни, но и улучшить когнитивные способности людей путем внедрения наноструктур в молекулярные и клеточные механизмы человеческого организма (Мамчиц и др., 2014). В области биомедицины сформировалось отдельное направление – наномедицина, призванная решать вопросы диагностики, лечения,

контроля биологических систем с помощью нанотехнологий (Евдокимов, 2008; Сейфулла и др., 2008).

В настоящее время в этой сфере выделяют 3 основных направления работы с наноструктурами: ранняя диагностика онкологических, сердечно-сосудистых, эндокринных заболеваний, от возможностей которой будет зависеть выживаемость пациентов; локальная доставка лекарственных препаратов; регенеративная медицина (синтез тканей, органов без последующего отторжения) (Поляков и др., 2008; Сейфулла и др., 2008; Абаева и др., 2010; Муртазина, Лефтерова, 2012; Мамчиц и др., 2014). Б.М. Гинзбург и соавторы в работе «Актуальность развития нанотехнологий и наноиндустрии в России» отмечают, что «наномир – мир высокоэффективных технологий, “умных” материалов, новых приборов и лекарственных веществ…» (Гинзбург и др., 2008, с. 42). Ведутся работы по разработке препаратов с привлечением нанотехнологий для раннего выявления и лечения СПИДа, неврологических заболеваний, лейкозов, сахарного диабета (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Сейфулла и др., 2008; Абаева и др., 2010; Арчаков, 2010; Бородкин, 2011). Важно отметить, что безопасность лекарственных нанопрепаратов полностью не подтверждена, в связи с тем что токсические риски сложно предвидеть (Латышевская, Стрекалова, 2011).

Следует отметить, что учеными затрагивается такой немаловажный вопрос, как создание единых нормативно-правовой и материально-технической баз для разработки безопасного применения нанотехнологий. Кроме того, подчеркивается необходимость модернизации медицинского образования с целью подготовки квалифицированных кадров в области нанотехнологий (Мамчиц и др., 2014). Особое внимание, по мнению исследователей, необходимо уделять изучению влияний УНТ на живой организм, выделяя, в первую очередь, нервную систему (Liu et al., 2014).

Л.М. Фатхутдинова в своей работе отмечает недостаточность знаний в области нанотоксикологии, отсутствие гигиенических нормативов и предельно допустимых концентраций для наночастиц (Фатхутдинова и др., 2009). Как следствие, работники производственных зон нанотехнологических отраслей

находятся в группе риска, и на сегодняшний день нет четких рекомендаций даже по проведению их профмедосмотров (Фатхутдинова и др., 2009). Предполагается уже сегодня применять банальные средства защиты и максимально исключить контакт с наноразмерными частицами сотрудников производств за счет автоматизации (Фатхутдинова и др., 2009).

О необходимости создания санитарно-гигиенических стандартов и норм высказываются и другие авторы (Латышевская, Стрекалова, 2011). Констатируется недостаточность знаний в совершенно новых областях науки, связанных с нанотехнологиями, касающихся вопросов побочных эффектов, о «поведении» наночастиц в живом организме; делается акцент на значительном отсутствии данных по вопросам их участия в биохимических процессах, кумуляции, элиминации, влиянии на цитологическом и гистологическом уровнях; отмечается неимение практических сведений о непредвиденных реакциях воздействия наночастиц на организм человека (Мешалкин, Бгатова, 2008). Н.Н. Каркищенко резюмирует, что в настоящее время развитие знаний в области нанотоксикологии характеризуется превалированием больше вопросов, чем ответов на них (Каркищенко, 2009).

В экологическом плане негативные последствия использования наноматериалов обусловлены следующими специфическими особенностями: повышенными реакционными возможностями наночастиц; высокой проникающей способностью; отсутствием возможностей нейтрализации в окружающей среде последствий их использования; отсутствием единой базы данных по контролируемому использованию и производству; недостаточным числом научных исследований по изучению экотоксических проявлений наноматериалов, в том числе и в организме человека (Баян и др., 2015).

В.Ю. Вишневецкий в статье «К возможности оценки влияния наноразмерных частиц как загрязняющих веществ на окружающую среду» описывает возможности «зеленой нанотехнологии», цель которой научиться производить и использовать наноструктуры без вреда для окружающей среды и для улучшения экологической ситуации в целом (Вишневецкий В.Ю.,

Вишневецкий Ю.М., 2008). Е.М. Баян, Т.Г. Лупейко, Н.К. Домницкий упоминают о модификации наночастицами уже известных материалов для повышения качества последних. Выпускаются нанопорошки на основе металлов и их оксидов (алюминия, титана, железа), карбиды для промышленных целей (Баян и др., 2015). Другими исследователями подчеркивается способность наноструктур в составе кормов увеличивать сопротивляемость к инфекциям и стрессам у сельскохозяйственных животных (Латышевская, Стрекалова, 2011; Крученецкий и др., 2013). Получена информация о преимуществах нанотрубок при производстве сельскохозяйственных удобрений (Гусев и др., 2010а). Существует мнение, что нанотехнологии помогут создать биоразрушаемые химикаты как альтернативу гербицидам и пестицидам (Латышевская, Стрекалова, 2011).

Исследователи отмечают широкое распространение наноматериалов в сферах, тесно контактирующих с бытовой жизнью человека. Углеродные нанотрубки отличаются повышенной прочностью, при сильных механических воздействиях способны к перестройке (Голубева, Полищук, 2012). Этот факт послужил основой для использования углеродных наноструктур не только в технической индустрии (Гинзбург и др., 2008; Гусев и др., 2010б; Бородкин, 2011; Муртазина, Лефтерова, 2012), но и в ткачестве – в производстве немнущейся ткани (Гинзбург и др., 2008; Муртазина, Лефтерова, 2012; Крученецкий и др., 2013). Сегодня наночастицы приобретают все большую популярность и в косметологии – в производстве не только питательных, солнцезащитных кремов, зубных паст, но и декоративной косметики, румян, губной помады (Каркищенко, 2009; Абаева и др., 2010; Муртазина, Лефтерова, 2012; Подколодная и др., 2012). При этом о содержании наночастиц в продуктах использования в большинстве случаев умалчивается (Fröhlich, Roblegg, 2012). Уже доказанным является факт о том, что недавно считавшиеся безопасными наночастицы диоксида титана, используемые в кремах, вызывают поражение клеток центральной нервной системы (ЦНС) и способны спровоцировать развитие оксидативного стресса, воспаления и онкологического поражения кожи за счет выраженной

каталитической активности, усиливающейся при ультрафиолете (Абаева и др., 2010; Попов, 2013).

Другими сферами, где человек непосредственно может столкнуться с наночастицами, является производство бытовой химии и, что еще больше вызывает опасения, пищевой продукции (Абаева и др., 2010; Подколодная и др., 2012). Л.Ф. Абаева и соавторы в своем обзоре ссылаются на 600 наименований пищевых продуктов, содержащих наночастицы разного рода, – от кетчупов до хлебобулочных изделий (Абаева и др., 2010). В других источниках перечисляются направления пищевой промышленности, которые в будущем предполагают использование нанобиотехнологий с целью улучшения вкусовых качеств и функционализации наноразмерными витаминами: это молочная промышленность, виноделие, сыроварение, хлебопечение, кофейная продукция (Крученецкий и др., 2013). Авторами исследования отмечается, что пищевые продукты, модифицированные наноструктурами, способны улучшать здоровье человека (Крученецкий и др., 2013). В.Ю. Вишневецкий, Ю.М. Вишневецкий особо отмечают невозможность отследить количество всех товаров, содержащих в своем составе наночастицы, по причине банального скрытия подобной информации производителями (Вишневецкий В.Ю., Вишневецкий Ю.М., 2008). Данная архиважная проблема, по их мнению, должна быть взята под контроль государственными структурами (Вишневецкий В.Ю., Вишневецкий Ю.М., 2008).

1.2 Влияние углеродных наноматериалов на окружающую среду

Учитывая перспективность использования наноструктур в различных областях науки, и главным образом биомедицины, ученые призывают не забывать о высокой биологической активности наночастиц и учитывать тот факт, что безответственное применение такого рода частиц в различных отраслях может привести к фатальным последствиям. В большинстве работ авторы поднимают вопросы экологической безопасности и оценки возможных рисков при применении различных видов наночастиц (Сейфулла и др., 2008; Каркищенко,

2009; Абаева и др., 2010; Арчаков, 2010; Добрецов и др., 2010; Мамчиц и др., 2014; Delorme et al., 2012). Но при этом в научной литературе отмечается недостаток знаний в области безопасного применения наноматериалов (Ivani et al., 2016). Например, С.Б. Ловерн с соавторами поднимают вопрос о необходимости исследований поведения наноматериалов в водной среде, так как риск поступления наночастиц со сточными водами достаточно актуален и высок (Lovern et al., 2007). Зарубежные работы последнего времени также посвящены исследованию токсичности наноматериалов в водной экосистеме, в которых высказываются предупреждения о том, что углеродные нанотрубки могут стать серьезной экологической проблемой загрязнения природных вод (Boncel et al., 2015; Wang et al., 2016a).

Исследователи, изучая вопрос влияния токсичности наноматериалов на представителей подрода Daphnia magna, пришли к выводам о способности нанотрубок адсорбировать различного рода загрязнители, тяжелые металлы, ароматические красители и увеличивать их токсичность, выступая в роли «троянского коня» (Boncel et al., 2015; Wang et al., 2016a; 2016b).

Исследований по проблеме токсического действия УНТ немало, однако большинство из них посвящено изучению влияния углеродных нанотрубок на живые организмы, а исследований поведения нанотрубок в водной и других жидких средах как источников порождения возможной техногенной катастрофы проводилось сравнительно мало (Walther et al., 2000; Bandyopadhyaya et al., 2002; Douroumis et al., 2007). К работам по изучению поведения УНТ в жидких средах можно отнести статью (Walther et al., 2000), в которой представлена молекулярная модель динамики нанотрубок в воде; показано, что вклад квадруполей в общее взаимодействии частиц незначителен. Данные по влиянию поверхностно-активных веществ (ПАВ) на стабильность УНТ в воде во взвешенном состоянии представлены в работе (Matarredona et al., 2003); рассмотрен эффект функционализации поверхности УНТ вследствие препаративных операций и очистки от примесей кислотами в процессе взаимодействия в системе «УНТ – ПАВ». В публикации (Bandyopadhyaya et al., 2002) описана методика разделения

пучков одностенных УНТ на отдельные нанотрубки в водном растворе гуммиарабика, которая обусловлена физической адсорбцией полимера. Среди исследований по стабилизации коллоидов УНТ в водных растворах можно выделить работу (Douroumis et al., 2007), в которой рассмотрено «обертывание» одностенных УНТ молекулами липида, а также описана электрофоретическая подвижность одностенных УНТ в водном растворе липидов измеренными ζ-потенциалами. К.С. Голохваст и соавторы экспериментально на морских ежах установили формирование стойкого токсического эффекта, проявляющегося уже через два часа после действия МУНТ, содержащих в дозе 5 мг/мл примеси тяжелых металлов (железа, кобальта, алюминия) и углеродных нановолокон (нарушения развития личинок); через сутки последствия выражались в массовой гибели подопытных (Голохваст и др., 2013а).

Большинство исследователей сходятся во мнении о недостаточности доказательной базы и необходимости изучения характера влияния наночастиц на флору, что обусловлено все большим проникновением наночастиц в окружающую среду, в том числе и в качестве сельскохозяйственных удобрений (Гусев и др., 2010б; Бородкин, 2011; Голубева, Полищук, 2012; Гусев и др., 2013а). Особое значение приобретает способность наноразмерных структур накапливаться в организмах животного и растительного происхождения, как фактор, увеличивающий в разы возможность распространения по трофической цепи: почва → растения → животные → человек (Латышевкая, Стрекалова, 2011; Попов, 2013; Ибраев и др., 2015). Согласно данным ряда авторов, токсичность УНМ может зависеть от способа проникновения в организм (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Фатхутдинова и др., 2009; Фирстова и др., 2011).

1.3 Влияние углеродных наноматериалов на состояние живых организмов

С. Шарифи и соавторы в своем обзоре пришли к выводу о невозможности точного определения поведения наноматериалов in vivo, так как такие параметры, как токсичность, распределение, зависят от характеристик самих наноматериалов:

типа, формы, дозы, агрегатного состояния и т. д. (Sharifi et al., 2012). В качестве наиболее важных характеристик выделяют размер частиц и площадь поверхности, на которой происходит химическое взаимодействие с биологическими агентами (Sharifi et al., 2012). Исследования механизмов участия в метаболических процессах, распределения и способов выведения из организма должны пролить свет на потенциальные негативные последствия контакта с наночастицами для живых организмов и оценить соответствующие риски (Patlolla et al., 2011).

В научной литературе с геометрической прогрессией растет число публикаций о характеристиках токсических свойств углеродных наноматериалов для живых организмов (Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Голубева, Полищук, 2012; Ивонин и др., 2012; Голохваст и др., 2013а; Гусев и др., 2013б). Негативные влияния, оказываемые углеродными наноструктурами на разнообразные формы живых организмов, авторы связывают с физико-химической природой наночастиц (Подколодная и др., 2012; Wang et al., 2011a; Oberdörster et al., 2015). В исследовательских работах указывается взаимосвязь уровня токсичности и определенных характеристик нанотрубок: длины, диаметра, – чем меньше эти показатели, тем токсичнее наноматериалы. На уровень токсичности оказывают влияние наличие примесей, особенности химических связей между атомами на поверхности. Кроме того, предполагается более выраженная токсичность у одностенных нанотрубок, по сравнению с многостенными, наличие функциональных групп (Евдокимов, 2008; Супотницкий и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Голохваст и др., 2013а; Ибраев и др., 2015; Sharifi et al., 2012; Darne et al., 2014; Fu et al., 2014; Liu et al., 2014; Boncel et al., 2015; Dal Bosco et al., 2015; Poulsen et al., 2015). Вопрос наибольшей токсичности частиц наименьшего размера объясняется увеличением площади поверхности и, соответственно, наличием неспаренных электронов на поверхности наночастиц. В силу этого реакционная способность резко возрастает (Sharifi et al., 2012).

Размер наночастиц определяет их проникающую способность. Есть данные, что чем меньше диаметр, тем больше проникающая способность.

Так, наноразмерные частицы диаметром до 100 нм проникают в клетки, менее 40 нм уже обладают способностью проникать в ядро клеток, менее 35 нм имеют возможность проникать через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) (Трофимова, 2015). Химическим механизмом окисления и повреждения нанотрубок является уменьшение числа валентных неспаренных электронов УНТ (Kagan et al., 2014). Природу токсичности углеродных нановолокон авторы связывают с формированием крупных агломератов, способных приводить к механическому повреждению клеток выступающими волокнами (Голохваст и др., 2013а). В.В. Фирстова и соавторы в работе по изучению влияния углеродных нанотрубок на иммунные клетки мышей допускают возможность пронзания цитоплазмы и ядер спленоцитов селезенки, приводящего к некрозу клеток (Фирстова и др., 2011). Ю. Евдокимов также отмечает способность углеродных нанотрубок буквально разрывать мембраны клеток (Евдокимов, 2008).

В ряде работ подчеркивается особая биологическая активность поверхностей подобных частиц. За счет этого наночастицы способны контактировать не только с клеточными формами (эндотоксины, митотоксины), но и с белками, липидами, ДНК, РНК клеток (Евдокимов, 2008; Каркищенко, 2009; Латышевская, Стрекалова, 2011; Подколодная и др., 2012; Горшенева, 2014). Особо отмечается вероятность образования веществ с неясными физико-химическими свойствами за счет высокой биологической активности (Евдокимов, 2008). Еще одним фактором, определяющим повышенную токсичность наночастиц и их опасность для организмов, является описанная в литературе трудная и низкая эффективность дезактивации наночастиц в силу их механической прочности (Каркищенко, 2009). О крайне высокой стабильности как критерии токсичности наночастиц упоминается в ряде источников, подчеркивая их невозможность к биотрансформации и выведению из организма (Евдокимов, 2008; Латышевская, Стрекалова, 2011; Ибраев и др., 2015).

Однако есть работы, отмечающие возможность биодеградации углеродных нанотрубок. В обзоре (Sharifi t al., 2012) показаны возможные пути экскреции разного рода наночастиц, в которых задействованы железы внешней секреции,

система дыхания, выделительная система, система пищеварения (экскреция со слюной и каловыми массами), а также семенная жидкость (Николаев, Яковлева, 2009; Sharifi et al., 2012).

Эндоцитоз напрямую зависит от размеров наночастиц (Sharifi et al., 2012). Существуют данные о преобладании эндоцитоза сферических наночастиц над цилиндрическими и волокнистой природы (Sharifi et al., 2012). Эндоцитоз осуществляется ретикулоэндотелиальной системой и эффективен против химических агентов, но исследователи говорят о резком снижении эффективности эндоцитоза для частиц размером 10 нм и менее (Николаев, Яковлева, 2009).

Утверждается возможность биодеградации одностенных нанотрубок в результате воздействия не только химических окислителей, но и естественных ферментативных систем, участвующих в осуществлении врожденного неспецифического иммунитета, ряда пероксидаз, например эозинофильной пероксидазы, оксиданта эозинофилов в комплексе с H2O2, а также отмечается усиление биодеградации в присутствии бромида натрия (Andón et al., 2013; Kagan et al., 2014). Есть данные о возможности биорегресса нанотрубок миелопероксидазой нейтрофилов в комплексе опять же с гидроперекисью за счет образования гипохлорита и пероксинитрита (ONOO–) (Власова и др., 2011; Kagan et al., 2014).

Рядом авторов работ описываются возможные механизмы цитотоксичности. Отмечается обусловленность развития патологических изменений, таких как механические и химические повреждения биологических мембран, возникновение дефектов органоидов, нарушения регуляторных механизмов на молекулярном и биохимическом уровнях, оксидативный стресс (Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Голубева, Полищук, 2012; Подколодная и др., 2012; Гусев и др., 2013б).

Исследователи обращают внимание на генотоксичные и мутагенные свойства углеродных наноматериалов. Известна способность одностенных нанотрубок повреждать митохондриальную ДНК, оказывать влияние на экспрессию генов, нарушать митотическое деление, ингибировать процессы

транскрипции и репликации, нарушать нуклеотидную последовательность (Гуськов и др., 2009; Каркищенко, 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Гусев и др., 2010б; Латышевская, Стрекалова, 2011; Подколодная и др., 2012; Yang et al., 2010).

Приводятся данные, подтверждающие превышение в разы, по разным данным – от 3 до 10 раз, уязвимости митохондриальной ДНК, по сравнению с ядерной (Гуськов и др., 2009). Среди возможных причин отмечается отсутствие гистонов, концентрация липофусцина (Гуськов и др., 2009). Среди возможных причин мутагенных трансформаций выделяются активные формы кислорода (АФК), перекисное окисление липидов (ПОЛ) (Гуськов и др., 2009). Нарушения в химической структуре ДНК при действии агрессивных форм кислорода дифференцируются на три категории: изменение в структуре дезоксирибозы; установление дополнительных ковалентных связей; повреждения оснований (Гуськов и др., 2009). Также одной из причин негативных эффектов на уровне генов и ДНК называется способность наночастиц высвобождаться из везикул в цитоплазму после захвата и проникать в ядро (Латышевская, Стрекалова, 2011; Подколодная и др., 2012). Двойные разрывы ДНК, как наиболее тяжелые последствия окислительного поражения, также могут наблюдаться при действии наночастиц (Sharifi et al., 2012).

Вследствие этого, один из главных вопросов нанотоксикологии – вопрос отсроченного влияния при разных путях проникновения (Латышевская, Стрекалова, 2011; Shvedova et al., 2014) остается открытым, и данных ничтожно мало. Известно, что УНТ обладают способностью аккумуляции в тканях и органах (Liu et al., 2014). Авторами отмечается факт обнаружения МУНТ в альвеолярных и лимфоидных клетках по истечении 6–12 месяцев (Patel, Kwon, 2012; Shvedova, et al., 2014). Ц. Дарн и соавторы в исследовании не зафиксировали влияния примесей на цито- и генотоксичность, но отмечают способность МУНТ с наименьшим диаметром вызывать более сильные цитотоксические последствия на клеточном уровне (Darne et al., 2014).

Несмотря на великое множество статей как в отечественной, так и в зарубежной литературе, подтверждающих токсический эффект углеродных наноструктур (Евдокимов, 2008), имеют место быть публикации, авторы которых высказываются о недоказательности, а только о потенциальных возможностях проявления подобных эффектов нанотрубок (Каркищенко, 2009; Фатхутдинова и др., 2009). Л.М. Фатхутдинова и соавторы приводят данные метаанализа, где в качестве вывода приводится уровень токсичности нанотрубок, «до некоторой степени вероятный» (Фатхутдинова и др., 2009). А.А. Гусевым и соавторами отмечается вероятность соотнесения МУНТ по классу опасности к веществам уровня от малоопасных до умеренно опасных, сравнимых по токсичности с природной углеродной сажей (Гусев и др., 2013б). При сравнении идентичных доз для оценки токсичности углеродных нанотрубок, сажи и кварца исследователи пришли к выводу о наиболее токсических проявлениях у углеродных нанотрубок, по сравнению с другими исследуемыми образцами. При этом сажа проявляла наименьшие токсические свойства для дыхательной системы (Lam et al., 2006). В другой работе отмечается возможность соотнесения МУНТ к 3–4-му классу опасности (Гусев и др., 2010а). В ряде исследований представлены результаты сравнения токсических эффектов, оказываемых углеродными нанотрубками, с подобными проявлениями асбеста, отличающегося своей агрессивностью и канцерогенностью (Евдокимов, 2008; Фатхутдинова и др., 2009; Teeguarden et al., 2011; Shvedova et al., 2014; Chen et al., 2015), что порождает вопрос о возможностях стимуляции злокачественного опухолеобразования УНМ (Chen et al., 2015).

Моримото и соавторами отмечается отсутствие полной доказательной базы о токсичности наночастиц (Morimoto et al., 2013), обосновывается необходимость проведения исследований по изучению негативных эффектов на организм при различных способах поступления (Morimoto et al., 2013).

В ряде работ данные о токсичности наночастиц неоднозначны и даже противоречивы. Это обусловливает актуальность проведения серьезной научной работы в данном направлении с целью устранения пробелов в насущных вопросах

нанотоксикологии (Сейфулла и др., 2008; Каркищенко, 2009; Абаева и др., 2010; Баян и др., 2015). О причинах противоречивости упоминают Ц. Дарн и соавторы, предполагая, что их причиной является использование в научных экспериментах разных типов углеродных наноматериалов, отличающихся по физико-химическим параметрам (Darne et al., 2014).

Научных исследований, посвященных вопросам влияния наноматериалов на организм человека, ничтожно мало (Попов, 2013). В ряде работ особо отмечается недостаточность научных исследований по проблемам кумуляции и перемещения наночастиц, учитывая их неспособность к элиминации (Мешалкин, Бгатова, 2008; Латышевская, Стрекалова, 2011). Ряд ученых предполагает, что потенциальные такого рода проявления МУНТ возможны за счет сходства в физико-химическом строении, а именно волокнистой структуры и способности пребывать в тканях длительное время (Евдокимов, 2008; Фатхутдинова и др., 2009; Teeguarden et al., 2011).

При анализе литературных источников были выявлены факторы развития деструктивных изменений под действием углеродных наночастиц в дыхательной системе, к которым можно отнести: синтез цитокинов, оксидативный стресс, воспалительный процесс, пролиферацию фибробластов, увеличение синтеза коллагена, снижение эластических свойств легких, нарушение газообмена, легочную недостаточность (Murray et al., 2012; Manke et al., 2013; Wang et al., 2011a). Не исключается возможность возникновения опухолей вследствие окислительного разрушения клеток, генетического материала и нарушения регуляции митотического деления с усилением апоптической активности (Fu et al., 2014).

Ю.П. Мешалкин, Н.П. Бгатова подчеркивают отсутствие знаний о влиянии наноматериалов на активизацию ангиогенеза и эндотелиальных клеток как актуальном вопросе развития онкологии (Мешалкин, Бгатова. 2008). Отмечая наличие сведений об активизации ангиогенеза in vivo, in vitro как одной из функций IL-8 (Часовских и др., 2009), можно предположить о возможности

стимулирования опухолевого роста при действии наноструктурированного материала.

Существуют данные о проявлении углеродными нанотрубками канцерогенных свойств по отношению к эпителиальным клеткам легких в течение 6 месяцев субхронического воздействия дозы 1 мкг/мл в виде ингаляций (Chen et al., 2015). Есть предположения об идентичности размеров нанотрубок и микротрубочек митотического веретена, тем самым углеродные нанотрубки могут быть включены в процесс формирования митотического веретена и его разрушения, нарушая ход митоза и вызывая анеуплоидии и мультиполярный митоз, образование микроядер и ядерных протрузий, снижение митотического индекса (Darne et al., 2014; Shvedova et al., 2014; Chen et al., 2015). Среди других возможных механизмов действия УНТ и УНВ выделяют стимуляцию канцерогенных сигнальных путей CRAS даже по истечении 12 месяцев, нарушение процесса апоптоза (Shvedova et al., 2014; Chen et al., 2015).

Моримото и соавторы, а также другие исследователи подчеркивают существенную роль физического состояния агрегированных либо диспергированных наночастиц в выраженности проявлений токсичности в дыхательной системе (Супотницкий и др., 2009; Morimoto et al., 2013; Shvedova et al., 2014). Существует вероятность возникновения появления гранулем и интерстициального фиброза при действии агломератов УНТ (Супотницкий и др., 2009; Morimoto et al., 2013). О токсическом влиянии агломератов высказываются и другие авторы (Belyanskaya et al., 2009; Sohaebuddin et al., 2010; Dahm et al., 2015; Dal Bosco et al., 2015). Л. Белянская и соавторы приводят мнение о более токсичном эффекте агломератов по отношению к нейронам и глиальным клеткам (Belyanskaya et al., 2009). С. Ли и соавторы изучили влияние уровня проявления токсичности и степени дисперсности МУНТ на иммунные клетки селезенки мышей. При внутривенном введении дозы 1 мг/ кг в сутки в течение 2 недель установлено проявление более выраженных негативных явлений в спленоцитах у менее диспергированных. Также отмечается отсутствие проявлений

иммунотоксичности углеродных наночастиц с высокой степенью дисперсности (Lee et al., 2015a).

Научные исследования по изучению токсичности углеродных наноструктур проводятся учеными на различных таксономических категориях. В работе «Влияние углеродного нановолокна на физиологию Дрозофилы» представлены результаты исследования влияния разных дозировок углеродных нановолокон на физиологические показатели жизненного цикла дрозофилы. Установлено токсическое влияние в дозе 1000 мкг/мл на показатели выживаемости и развития личинок, продолжительность жизни взрослых особей, способность к размножению (Lee et al., 2015b). Противоположные эффекты замечены при пероральном введении низких доз углеродных нановолокон. По данным авторов, длительная экспозиция в концентрации 100 мкг/мл токсического влияния не оказывала, наоборот, улучшались показатели жизненного цикла дрозофилы. Ученые объясняют подобные позитивные явления легкой стимуляцией антиоксидантной системы низкими дозами УНВ, тем самым улучшая функциональное состояние организма (Lee et al., 2015b).

В ряде работ выполнен анализ результатов научных исследований с участием сельскохозяйственных растений, авторы которых подтверждают активизирующее влияние разных концентраций МУНТ на вегетацию растений (Голубева, Полищук, 2012; Гусев и др., 2013a). С одной стороны, наноматериалы могут оказывать стимулирующее влияние за счет формирования дополнительных водных каналов, и с другой – порождать негативные эффекты, связанные с деструктивными изменениями и окислительным стрессом в клетках (Голубева, Полищук, 2012; Гусев и др., 2013a). В эксперименте по комплексному биотестированию углеродного наноматериала с участием сельскохозяйственных растений пшеницы, гороха и подсолнечника исследователи обнаружили разноплановые эффекты. Отмечены как негативное действие на онтогенез растений, так и активизирующее влияние на корневую систему и всхожесть, а также снижение уязвимости к гниению, что авторы связывают, возможно, с пагубным влиянием на микробиоту (Гусев и др., 2010a).

Учеными экспериментально установлены базисные пути проникновения наноструктурированных наночастиц в организм. В первую очередь, это касается систем, находящихся в непосредственном контакте с окружающей средой. В связи с этим выделяют ингаляционный, пероральный, трансдермальный и интраназальный через ольфакторный тракт пути проникновения (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Сейфулла и др., 2008; Супотницкий и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Подколодная и др., 2012; Гусев и др., 2013б), позволяющие наночастицам без особых трудностей попадать во внутреннюю среду организма и накапливаться в органах, в том числе в центральной и периферической нервной системе (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Супотницкий и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Подколодная и др., 2012; Гусев и др., 2013б; Мамчиц и др., 2014). О.А. Подколодная и соавторы в статье «Пути поступления наночастиц в организм млекопитающих, их биосовместимость и клеточные эффекты» приводят детальный обзор физиологических механизмов поступления и формирования наноструктурированными частицами токсичных эффектов в системах-мишенях (Подколодная и др., 2012). Отмечена абсорбционная способность клеток разной морфо-функциональной природы: дендритных, эпителиальных, энтероцитов, макрофагов, клеток эпидермиса, Пейеровых бляшек (Подколодная и др., 2012). Здесь же указывается на низкую абсорбционную способность слизистой ЖКТ (2–10% от общего числа наночастиц) (Подколодная и др., 2012). Подтвержденным является факт проникновения наночастиц размерами от 10 до 100 нм через естественные барьеры ЖКТ как при обычном, так и при зондовом способе кормления (Каркищенко, 2009). Сделан акцент на прецеденте гиперпоглащения наночастиц при повреждениях слизистых ЖКТ (Подколодная и др., 2012). К.С. Голохваст и соавторы гистологически подтвердили обнаружение МУНТ диаметром 18–20 нм в барьерных слоях, в цитоплазме и ядрах эпителиоцитов разных отделов ЖКТ, а также увеличение лимфоидных фолликулов. Здесь же авторами отмечается более высокая скорость проникновения через эпителий кишечника, чем через эпителий желудка (Голохваст и др., 2013а).

Авторы работ выделяют способность легких, почек, печени, костного мозга, лимфоузлов концентрировать наночастицы (Подколодная и др., 2012; Мамчиц и др., 2014). Отмечаются данные о способности наночастиц размером менее 34 нм поступать в лимфатическую систему (Shvedova et al., 2014). В научных источниках обозначается восприимчивость органов ретикулоэндотелиальной системы для сосредоточения УНТ (Фирстова и др., 2011). В.В. Фирстова и соавторы с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) установили время, при котором обнаруживаются МУНТ диаметром 36–40 нм в селезенке и межклеточном пространстве. При внутривенном и аэрозольном вариантах введения наноструктур период составил до 1 часа, а при трансдермальном введении срок увеличивался до 24 часов (Фирстова и др., 2011).

Ряд авторов работ сходятся во мнении, что наноструктуры способны беспрепятственно преодолевать гистогематические, в том числе и гемато-энцефалический, биологические барьеры организма (Сейфулла и др., 2008; Каркищенко, 2009; Супотницкий и др., 2009; Абаева и др., 2010; Подколодная и др., 2012; Голохваст и др., 2014). О проникающей способности углеродных нанотрубок для плацентарного барьера с тератогенными последствиями сообщается в разных источниках (Campagnolo et al., 2013; Ema et al., 2016). Учитывая уязвимость внутриутробного периода к действию различного рода внешних агентов, увеличивающих риски нарушения органогенеза, в первую очередь поражения ЦНС, актуальность исследований о влиянии наночастиц на развитие плода не вызывает сомнений, так как подобные поражения, как правило, имеют долгосрочные эффекты (Cui et al., 2014; Feng et al., 2015). При экспозиции беременных самок дозировкой 30 мкг/мышь функционализированными полиэтиленгликолем ОСУНТ, нанотрубки обнаруживались в желточном мешке и плаценте (Campagnolo et al., 2013). Инъекционное воздействие нанотрубками на беременных самок может приводить к разным патологическим состояниям у потомства, в том числе и изменениям в ЦНС (Ema et al., 2016). Подтверждена хорошая проникающая способность аэрогематического барьера для наночастиц (Супотницкий и др., 2009; Гусев и др., 2013б).

Мнения авторов исследований о пропускной способности трансдермального пути для наночастиц разделились, выводы в научных работах довольно спорные. М.В. Супотницкий приводит сведения о пропускной способности эпидермиса, а также излагает возможность проникновения наночастиц в дерму, делая возможным рассеивание наночастиц в организме (Супотницкий и др., 2009). Ю.М. Евдокимов отмечает возникновение окислительного стресса с образованием продуктов перекисного окисления в клетках кожи человека при действии углеродных нанотрубок (Евдокимов, 2008).

В других источниках подчеркивается непропускная способность эпидермиса здоровой кожи, но предполагается, что повреждения увеличивают ее проницаемость; описывается возможность инфильтрации небольшого количества наночастиц в лимфатическую систему и кровоток (Абаева и др., 2010; Подколодная и др., 2012). Наряду с повышением проницаемости поврежденной кожи, отмечается и возможность проникновения наночастиц в местах сгибов или при ультрафиолетовом облучении (Супотницкий и др., 2009). Л.Ф. Абаева и соавторы подчеркивают отсутствие данных относительно дермальных нанорисков для детской и пораженной кожи (Абаева и др., 2010).

Интраназальный механизм аксонального транспорта через обонятельный тракт в ЦНС имеет подтверждение в научной литературе (Супотницкий и др., 2009; Попов, 2013). Закапывание в носовую полость раствора наночастиц подтвердило способность последних дислоцироваться не только в bulbus olfactorius, но и в других структурах головного мозга (Подколодная и др., 2012). Хотя вопрос распространения наночастиц по ЦНС также остается до конца не ясным. В опытах на мышах показано, что распределение наночастиц возможно в системах органов, но исключение составляет головной мозг (Фатхутдинова и др., 2009). Р.Д. Сейфулла и соавторы в своей работе обращают внимание на существование специальных требований для наноструктур, способных преодолевать гемато-энцефалический барьер. Такие частицы должны обладать размером не более 100 нм, способностью к биодеградации, отличаться

стабильностью в крови, нетоксичностью, биосовместимостью (Сейфулла и др., 2008).

Другие исследователи высказываются о потенциальной опасности техногенных наночастиц для человека и окружающей среды в целом (Wang et al., 2011a). Ингаляционные нанориски превышают риски, связанные с другими путями проникновения (Shvedova et al., 2014). Очевидным является факт, что сегодня в мире одним из основных источников наночастиц является атмосфера (Горшенева, 2014). В научной литературе подчеркивается возможность выделения техногенных наночастиц и углеродных в частности при сгорании угля, органических газов: пропана, метана, в составе выхлопных газов, табачного дыма, при электросварочных работах (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Попов, 2013; Голохваст и др., 2014; Мамчиц и др., 2014; Ибраев и др., 2015; Lam et al., 2006). Об опасности наночастиц выхлопных газов высказывается Е.М. Попов. В своей статье «Эколого-экономическое обоснование перспективности развития технологий, основанных на применении самых распространенных наночастиц» автор отмечает способность наночастиц диаметром до 100 нм при ингаляционном способе поступления проникать в головной мозг (Попов, 2013). Здесь же он приводит результаты независимых зарубежных исследований, подтверждающих в зонах сильной загазованности нарушение психических процессов, снижение интеллектуальных способностей, обучаемости и компонентов, формирующих целенаправленное поведение у детей (Попов, 2013).

М.В. Супотницкий и соавторы указывают на повышеннный риск контакта с наноструктурами в связи с их способностью достигать высокой плотности при небольшом объеме диспергированного вещества (Супотницкий и др., 2009). что способствует быстрому проникновению достаточно большого количества наночастиц в дыхательные пути. Во многих научных работах приводятся сведения о токсичном влиянии на органы дыхания (Супотницкий и др., 2009) и затрагивается вопрос о дыхательной экспозиции. Отмечается существование рисков ингаляционной экспозиции не только в производственных помещениях, но и на открытых пространствах за счет агрегации нанотрубок в воздухе и топливе

(Евдокимов, 2008). Подчеркивается особая патогенность наночастиц дымов для нейронов (Попов, 2013), повышен риск развития легочно-сердечной недостаточности (Lam et al., 2006). В работе Е.Б. Горшеневой есть сведения о прямой зависимости уровня смертности от заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной систем и концентрации наночастиц в атмосфере (Горшенева, 2014).

Другими исследователями отмечается способность УНМ вызывать тромбоз в связи с активацией агрегации тромбоцитов при контакте с форменными элементами крови и способствовать увеличению атеросклеротических бляшек в крупных сосудах, аорте, брахиоцефальных артериях, провоцирующих патофизиологические проявления в работе сердечно-сосудистой системы (Зиганшин, Зиганшина, 2008; Каркищенко, 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Подколодная и др., 2012; Мамчиц и др., 2014; Lam et al., 2006; Castranova et al., 2013). В работе «Toxicity of nanomaterials» авторы выделяют способность частиц несферической формы в капиллярах задерживаться у эндотелия, что и влечет патологические изменения в системе гемостаза (Sharifi et al., 2012). В. Кастранова и соавторы в своей работе описывают возможность повышения тонуса коронарных артериол (Castranova et al., 2013), а также высказывают предположение об опосредованном влиянии УНМ через цитокины на сердечно-сосудистую систему (Castranova et al., 2013).

Материалами научных литературных источников подтверждается прямая корреляция между дозозависимым эффектом и выраженностью воспалительного процесса, даже при однократной экспозиции наночастицами (Мамчиц и др., 2014; Delorme et al., 2012; Liu et al., 2014; Dal Bosco et al., 2015). Разные исследователи, в дополнение к дозозависимости как фактору, определяющему уровень токсичности, соотносят пролонгированность контакта с наночастицами, активностью поверхности (Латышевская, Стрекалова, 2011; Murray et al., 2012).

Н.И. Латышевская и А.С. Стрекалова, а также С.А. Ибраев приводят точки зрения о неспособности распознавания наноструктур защитными системами за счет малых размеров (Латышевская, Стрекалова, 2011; Ибраев и др., 2015). Интересен факт, описанный в статье С.А. Ибраева, о том, что макрофаги

неспособны распознать наночастицы размером менее 70 нм (Ибраев и др., 2015).

Различными данными подтверждается развитие затяжного воспалительного процесса в организме под воздействием углеродных нанотрубок и нановолокон. Доказан факт возникновения стойкого окислительного стресса и повышенной фагоцитарной активности (Супотницкий и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010; Гусев и др., 2010б; Подколодная и др., 2012; Мамчиц и др., 2014; Liu et al., 2014), учитывая, что для активной фагоцитарной активности необходимы радикальные формы кислорода (Гуськов и др., 2009). Под окислительным стрессом понимается нарушение равновесия между производством активных форм кислорода и их инактивацией (Liu et al., 2014; Ma et al., 2015). C. Copc и соавторы в своей статье ссылаются на гиперчувствительность головного мозга к свободнорадикальному окислению и в качестве факторов, отвечающих за подобного рода уязвимость, приводят недостаточность антиоксидантной системы мозга, высокий уровень потребления кислорода и избыток липидных структур, подвергающихся окислению (Sorce, Krause, 2009). Н.В. Трофимова с соавторами показали дозозависимый эффект усиления показателей фагоцитоза нейтрофилами при действии УНТ (Трофимова и др., 2012). Об усиленной продукции АФК высказываются и другие исследователи (Дятлов и др., 2011; Латышевская, Стрекалова, 2011; Голубева, Полищук, 2012; Голохваст и др., 2013а; Yan et al., 2013; Akhtar et al., 2014; Fu et al., 2014).

В научной литературе обозначается факт усиления АФК при наличии металлов, обладающих окислительно-восстановительными свойствами (Гуськов и др., 2009). Учитывая, что для производства углеродных нанотрубок и нановолокон необходимо присутствие в качестве катализаторов подобных металлов и неочищенные наноструктуры имеют их в своем составе, можно предполагать, что гиперпродукция АФК и выраженность оксидативного стресса в немалой степени зависят и от данного факта (Гуськов и др., 2009). Гиперпродукция реактивных форм кислорода, по данным источников, является приоритетным механизмом проявления токсических свойств наночастиц

в организме (Подколоднаяи др., 2012). А.А. Гусев и соавторы отмечают недостаточность фагоцитарной активности для поглощения больших частиц многослойных нанотрубок. В результате компенсация осуществляется за счет усиленной продукции АФК (Гусев и др., 2010б).

Важно обозначить мнение авторов о возможности использования АФК в качестве биомаркеров для оценки физиологических изменений in vivo при действии физико-химических факторов экзогенной природы (Гуськов и др., 2009).

По мнению ученых, стрессорные факторы нарушают функциональную активность антиоксидантной защиты (Ясенявская и др., 2013). Для нейтрализации АФК резервов антиокислительной системы оказывается недостаточно, что проявляется в истощении компонентов антиоксидантной защиты, в частности токоферола, и повышении продуктов перекисного окисления липидов (Фатхутдинова и др., 2009; Подколодная и др., 2012).

Исследования по изучению антиоксидантного действия витамина Е на культуры нервных клеток с вызванными предварительно цитотоксичными эффектами МУНТ показали способность токоферола оказывать позитивное влияние на клетки, подвергшиеся экспозиции МУНТ. Среди наблюдаемых эффектов зафиксировано снижение количества свободных радикалов и ПОЛ, снижение вероятности окислительного стресса митохондрий, стабилизирующее действие на мембраны данных органелл, а также повышение показателей каспазы-3, ферментов антиоксидантной системы глутатиона, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы (Wang et al., 2012). Об антиоксидантной роли витамина Е упоминается и в других работах (Baştuğ et al., 1998).

Ученые обращают внимание на морфофункциональные нарушения в клетках при пролонгированном оксидативном стрессе, возникающем при действии одностенных и многостенных углеродных нанотрубок. Последние способны вызывать провоспалительные эффекты и деструктивные изменения в виде апоптоза либо некроза в зависимости от выраженности и длительности окислительного стресса (Фатхутдинова и др., 2009; Абаева и др., 2010;

Подколодная и др., 2012; Голохваст и др., 2013а; Liu et al., 2014). Подчеркивается важная, основная роль окислительного стресса митохондрий как структур-источников продукции АФК, выработки проапоптозных факторов при истощении антиокислительной защиты (Лямзаев, 2007; Подколодная и др., 2012; Sorce, Krause, 2009).

Авторы ряда работ делают акцент на перестройку и снижение иммунного статуса организма при действии УНМ (Евдокимов, 2008; Абаева и др., 2010; Фирстова и др., 2011). В научной литературе описываются факты увеличения продукции провоспалительных интерлейкинов-6 и интерлейкинов-8 (Супотницкий и др., 2009; Фатхутдинова и др., 2009; Дятлов и др., 2011; Подколодная и др., 2012). Данные цитокины синтезируются иммунными клетками крови, эндотелиальными клетками (Часовских и др., 2009). Увеличение IL-8 является маркером воспалительного процесса и, соответственно, оксидативного стресса (Часовских и др., 2009). «Провоспалительный отклик» в виде синтеза цитокинов, как результат негативного влияния разного рода факторов, имеет последствия для свойств нервной системы: пластичности, нарушения передача импульсов по нейронным цепям в лимбической системе, расстройства в гуморальной регуляции функций (Gądek-Michalska et al., 2013).

О роли АФК в головном мозге для выделения провоспалительных цитокинов высказываются и другие авторы (Hsieh, Yang, 2013). Головной мозг с высокими метаболическими запросами и, соответственно, высокими потребностями в кислороде априоре отличается повышенным уровнем образования активных форм кислорода, находящихся под контролем антиоксидантной системы: каталазы, супероксиддисмутазы, пероксидазы (Sorce, Krause, 2009; Massaad, Klann, 2011; Feng et al., 2015). В норме физиологические значения активных форм кислорода необходимы для обеспечения познавательных функций (Massaad, Klann, 2011), но истощение антиоксидантов, повышение уровня свободных радикалов, в том числе супероксида, влечет повреждение нейронов, что и лежит в основе нарушения когнитивных функций и памяти (Massaad, Klann, 2011; Feng et al., 2015).

Ф. Мерфи и соавторы показали активизацию выделения макрофагами цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 при действии МУНТ как результат нарушения фагоцитоза (Murphy et al., 2012). Есть данные о непосредственном участии интерлейкина-1, интерлейкина-6 в патогенезе тревожных и депрессивных расстройств (Gądek-Michalska et al., 2013). Отмечаются более высокие концентрации IL-6 у грызунов с пассивной позицией (Gómez-Lázaro et al., 2011). Известно, что увеличение провоспалительных цитокинов ИЛ-6 влечет депрессию поведения, а ИЛ-10 способствует активизации исследовательской и двигательной активности у грызунов (Voorhees et al., 2013). М. Маес и соавторы приводят примеры влияния цитокинов на изменения в поведении. Отмечается, что ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-2 вызывают депрессию поведения у грызунов, проявляющуюся в угасании мотивированного поведения, исследовательской и двигательной активностей, снижении памяти, усилении тревожности, потери аппетита и ангедонии (Maes et al., 2012). Возможным механизмом является влияние цитокинов на уровень нейромедиаторных систем мозга (Maes et al., 2012).

Отмечается развитие депрессивных симптомов при активации иммунной системы (Yirmiya, 1996). Описывается развитие нарушений в виде ангедонии, снижении двигательной активности (Yirmiya, 1996). Ангедония может рассматриваться как снижение активности дофаминергической системы (Латюшин и др., 2006). В метаанализе «A meta-analysis of cytokines in major depression» выявили зависимость между развитием депрессии и концентрацией ИЛ-6 ($p < 0.00001$) (Dowlati et al., 2010).

Нейроповеденческих исследований проведено малое количество, но, по мнению авторов ряда работ, их преимущество в нанотоксикологии в том, что они предоставляют возможность оценить скрытые повреждения нервной системы (Tilson, 1987; Dal Bosco et al., 2015). В батарею поведенческих тестов, используемых для оценки токсичности веществ, включаются те, которые оценивают двигательную активность и ее нарушения, механизмы памяти и обучения (Tilson, 1987). Отмечается серьезность вопросов генерации окислительных повреждений в нейронах ЦНС, так как данные механизмы

являются непосредственными «участниками» патогенеза нейродегенеративных заболеваний (Hsieh, Yang, 2013; Dal Bosco et al., 2015). М. Эма и соавторы называют наряду с такими проявлениями токсичности, как структурные изменения, летальность, задержки развития, и функциональные и поведенческие нарушения (Ema et al., 2016).

При изучении нейроповеденческих изменений при действии ОСУНТ в тестах водного лабиринта Морриса и «открытого поля» (ОП) установлен дозозависимый эффект снижения когнитивных функций, двигательной активности и способности к обучению при введении нанотрубок в дозировке 6,25 и 12,50 мг/кг / день с увеличением тревожности, проявляющейся в увеличенной степени дефекации. В этом же комплексном исследовании выделен факт нарушения процессов памяти. Авторами работы акцентируется внимание на роли поражения нейронов дорсальной части, пирамидных нервных клеток гиппокампа в формировании тревожности, снижении когнитивных способностей и двигательной активности при дозировке 6,25 и 12,50 мг/кг / день ОСУНТ. Как возможные причины негативных влияний описываются поражение механизмов синтеза медиаторов и нарушение нейротрансмиссии вследствие оксидативного стресса, воспалительных процессов и апоптической активности в головном мозге. Но при этом исследователи определили положительное влияние аскорбиновой кислоты на поведенческие характеристики у опытных групп, получавших антиоксидант в дозе 100 мг/кг / день (Liu et al., 2014).

Гиппокамп, как структура, обладающая хорошей пластичностью нейронов, особенно чувствительная структура к действию агрессивных факторов и окислительному стрессу (Williamson, Bilbo, 2013; Dal Bosco et al., 2015). Подчеркивается выраженная чувствительность CA1-области, так как высоки потребности в реактивных формах кислорода в качестве сигнальных молекул (Dal Bosco et al., 2015). Авторы исследования отмечают особую чувствительность гиппокампа к окислительному стрессу (Dal Bosco et al., 2015). Они же показали нарушения механизмов памяти через 30 минут после введения в дорсальную область гиппокампа дисперсии ОСУНТ, функционализированных

полиэтиленгликолем (ПЭГ) в дозировке 0,5 и 1,0 мг/мл и размером 88,1 и 104.8 нм. Но через сутки после инъекций ухудшения памяти не возникало, что, возможно, связано с цитопротекторным действием низкого по интенсивности окислительного стресса и мобилизации антиокислительной системы (Dal Bosco et al., 2015).

При оценке пренатального влияния ОСУНТ в дозировках 1 или 10 мг/кг исследователи определили уменьшение размеров помета и более высокий уровень тревожности в ПКЛ у группы, получавшей наибольшую дозу (Ivani et al., 2016), и зарегистрировали негативное влияние на развитие поверхностных рефлексов (Ivani et al., 2016). В своих выводах авторы отмечают отклонения в развитии восприятия и двигательной активности (Ivani et al., 2016).

Вышесказанное можно обобщить в следующих выводах:

Исследовательская активность в виде ориентировочных рефлексов (изменение позы животного, повороты головы на разного рода внешние раздражители) помогает животным знакомиться с новой обстановкой и предметами (Григорьев, 1998), а ПА требует, в первую очередь, найти предмет для его дальнейшего изучения (Григорьев, 1998).

Поиск может рассматриваться как стрессовая ситуация, требующая быстрого принятия решения, от качества которого будет зависеть выживаемость. При этом ПА реализуется посредством полученной информации за счет ИА на этапе афферентного синтеза (Григорьев, 1998).

Тревожность может нарушать поведенческие паттерны за счет нейрохимических и иммунных преобразований (Григорьев и др., 2006). По мнению авторов, разнонаправленные эффекты могут быть связаны с изменением гормонального статуса, выраженного в увеличении продукции катехоламинов и кортикостероидов. Эти гормоны оказывают генерализованные эффекты на системы организма и корректируют работу ЦНС, главным образом гипоталламуса, под действием окислительного стресса и развивающегося воспалительного процесса (Гусев и др., 2010б). На клетках PC12 *in vitro*

нейрональной линии определен дозозависимый эффект для свободнорадикального окисления и последующего апоптоза. Авторы исследования пришли к выводу о возможности запуска окислительных каскадных реакций в нейронах *in vivo*, что может стать причиной нейродегенеративных расстройств (Wang et al., 2011b).

Проанализировав авторские исследования, представленные обзоры и опираясь на теоретические данные, можно сформировать общую модель понимания проявлений токсичных свойств наноструктур.

Центральным звеном всех негативных последствий для различного рода клеток можно выделить окислительный стресс, нарушающий ход биохимических процессов и клеточного цикла, влекущий запуск программы естественной клеточной гибели, что согласовывается с данными и других авторов (Shvedova et al., 2012). Исследований, касающихся изучения влияния углеродных наноматериалов на высшую нервную деятельность и поведение в частности ничтожно мало. Данная область только начинает развиваться. Отмечается, что люди обладают низкой устойчивостью к действию нанотрубок, по сравнению с грызунами, и потому в большей степени имеют риски патологических изменений при контакте с наноматериалами (Liu et al., 2014). Обозначается недостаток знаний в области нейротоксичности (Hu et al., 2010; Liu et al., 2014). Причем важным моментом является отсутствие знаний в области процессов элиминации наночастиц в ЦНС (Feng et al., 2015), учитывая то, что нервная система обладает повышенной чувствительностью к действию углеродных наночастиц (Сахаров и др., 2010).

Предполагая, что наночастицы способны оказывать влияние на внутримозговые процессы (Каркищенко, 2009), достаточно остро ощущается недостаток сведений, касающихся их влияния на ВНД и поведение.

При подведении итогов анализа научных исследований по данной теме наблюдаются пробелы в области научных исследований по изучению влияния

наноматериалов на ВНД. Результаты работ, известных в настоящее время, являются противоречивыми. Существует точка зрения об отсутствии влияния наноматериалов на поведенческую активность крыс. Однако другие исследователи считают, что наночастицы способны оказывать влияние на психические функции. О «пробелах» в области знаний о нейротоксическом действии углеродных наноматериалов в естественных условиях высказываются и авторами ряда публикаций (Liu et al., 2014). Л. Белянская, так же как и другие авторы, отмечает недостаток знаний о цитотоксическом поведении УНТ на нервные клетки (Belyanskaya et al., 2009). Это имеет принципиальное значение, потому как нервная система наиболее чувствительна к загрязняющим агентам в окружающей среде (Ma et al., 2015). Следовательно, необходимы продолжительные научные исследования в данной области. Зарубежные публикации, как правило, направлены на оценку памяти и двигательной активности при введении разными способами наночастиц. Но учитывая то, что когнитивное поведение базируется на трех «китах»: гнозисе, праксисе и памяти (Григорьев, 1998; Григорьев и др., 2006), в нашем исследовании мы попытались дать оценку именно с этих позиций формирования когнитивного поведения. В обзоре «Toxicity of nanomaterials» описываются возможные механизмы, лежащие в основе токсичности разного рода наночастиц, но о влиянии наноструктур на ВНД и поведение сведений не обнаружено. Это также подтверждает наличие «белых пятен» в развитии данной области и острую необходимость проведения исследований в обозначенном направлении (Sharifi et al., 2012). Поэтому предлагаемое нами экспериментальное исследование по изучению влияния углеродных наноматериалов с дифференциальным подходом к сложнорефлекторному поведенческому акту по праву может считаться первым в своем роде. Работ по оценке влияния данных наноструктур на компоненты исследовательской и поисковой активности в отдельности и по оценке когнитивных способностей лабораторных животных до и после экспозиции в ходе подготовки обзора не установлено.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая схема исследования представлена на рисунке 1.

2.1 Физико-химическая характеристика УНМ

В работе использовалось два типа многослойных углеродных нанотрубок и два типа нановолокон. В таблице 1 представлены основные физико-химические параметры углеродных наноматериалов и их агрегатов.

Таблица 1

Физико-химические характеристики углеродных наноматериалов, используемых в эксперименте

Типы наноматериалов	Характеристика		
	Диаметр, нм	Длина, мкм	Площадь удельной поверхности (по результатам БЭТ), $м^2/г$
Углеродные нановолокна (УНВ)			
56ОБР (УНВ-1)	от 20 до 200 (в среднем 85)	5–50	125
КМ2-56БР (УНВ-2)			103
Многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ)			
SC3-1-FCA 10-5-E3p (МУНТ-1)	8–10	1–5 (агрегаты 5-100 мкм)	400
SC 3-2-FCC3-E3 (МУНТ-2)	18–20		130
Примечание – Здесь и далее таблицы составлены автором.			

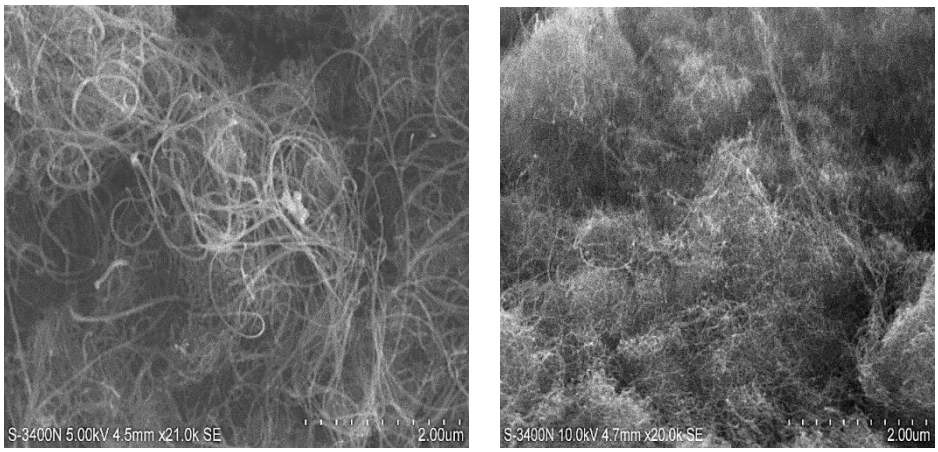
МУНТ синтезированы в Институте катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН) (Новосибирск) методом, описанным в работе (Kuznetsov et al., 2010).

Рисунок 1. Структурная схема эколого-биологического исследования углеродных наноматериалов

Примечание – Здесь и далее иллюстрации выполнены автором.

МУНТ-1 содержали примеси: Fe – 0,6%, Co – 0,3%, Al – 0,9%, а МУНТ-2: Fe – 0,2%, Co – 0,12%, Ca – 0,004%, Cl – 0,08%.

Наличие металлических примесей подтверждено фотографией (рисунки 2, 3), выполненных с помощью электронного микроскопа. Светлые участки свидетельствуют о наличии тяжелых фракций (в нашем случае – металлов) на поверхности МУНТ.

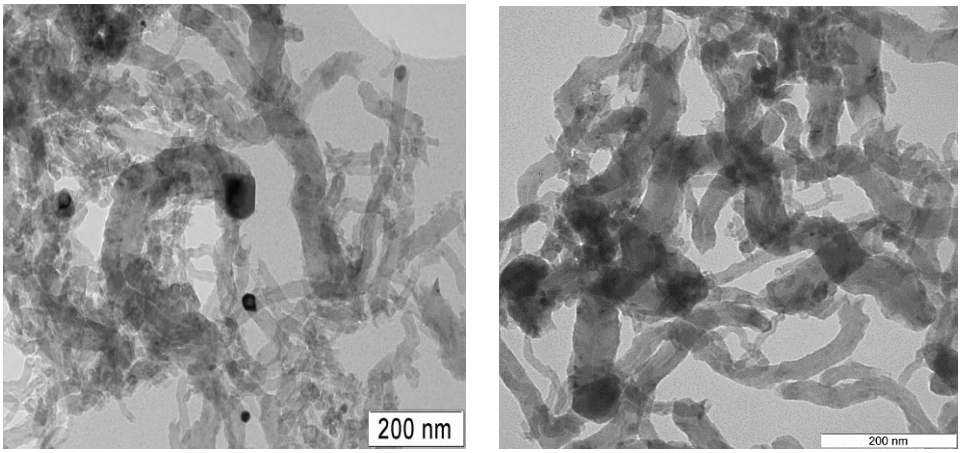


а б

Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия:

а – МУНТ-1; *б* – МУНТ-2. Измерительный отрезок 2 мкм

Физико-химические свойства УНВ, а также данные об их синтезе представлены в таблице 2.



а б

Рисунок 3. Просвечивающая электронная микроскопия:

а – КМ2-56БР; *б* – 56ОБР

Таблица 2

Физико-химические характеристики УНВ

Параметр	УНВ-1	УНВ-2
Морфология	fish bone («рыбья кость»)	fish bone («рыбья кость»)
Катализатор	90% Ni/Al_2O_3	90% Ni/Al_2O_3
Температура синтеза, °С	800	500
Измельчение в воде с керамическими шарами	24 часа	–
Содержание углерода в 100 мг образца в мг	99,6	96,0
Примеси, вес. %	Ni – следы Al_2O_3 – 0,4%	Al_2O_3 – 0,4% Ni - 3,6%

В таблице 3 представлены результаты лазерной гранулометрии.

Таблица 3

Морфометрические параметры УНВ двух типов

Тип УНВ	Среднеарифметический диаметр агрегатов УНВ, мкм	Площадь удельной поверхности УНВ, $см^2/см^3$
56ОБР	13,68	8 229,59
КМ2-56БР	25,22	8 983,11

Строение химических объектов определяет их свойства, тем самым, чтобы объяснить действие данных химических материалов на биологические объекты УНВ и МУНТ были исследованы с помощью распространенных методов используемых в естественных науках физико-химического профиля.

Оценки химической структуры нанообъектов произведена с помощью Раман-спектроскопии (спектроскопия комбинационного рассеяния) на приборе Morphologi-G3-ID (Malvern, Великобритания).

Спектрофотометрия кинетическим методом выполнена на двухканальном спектрофотометре Shimadzu UV 2550. Максимальное светопоглощение исследуемых образцов наблюдалось при длине волны 195 нм.

Физико-химические методы исследования заключались в том, что готовилась суспензия УНМ в водопроводной воде с концентрацией 100 мг/л. Ультразвуковое диспергирование раствора, произведено по методике, описанной в работе (Бирюкова, 2015) ультразвуковым диспергатором Bandelin Sonopulse HD 3100. Исследование проводилось в течение 3 мин (энергия (6384±120) кДж). После ультразвукового диспергирования воду с УНМ переливали в кювету объемом 4 мл и помещали в спектрофотометр. Исследование осуществлялось методом фотоколориметрии. Через каждую минуту в течение недели (всего 10 080 измерений) прибор снимал показания светопоглощения.

В качестве дисперсной среды использовалась водопроводная вода (Владивосток, ул. Пушкинская, 10, центральное водоснабжение). Химический анализ водопроводной воды осуществлялся масс-спектрометрическим методом высокого разрешения с ионизацией в индуктивно-связанной плазме.

Проба воды объемом 5 мл была исследована на масс-спектрометре Element XR (фирма «Thermo Scientific») согласно методике, изложенной в ЦВ 3.18.05-2005. ФР.1.31.2005.01714 «Качество воды. Методика выполнения измерений элементного состава питьевых, природных, сточных вод и атмосферных осадков методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно связанной плазме» (ЦВ 3.18.05-2005), для изучения микроэлементного состава проб в ДВГИ ДВО РАН (таблица 4).

Таблица 4

Химический состав водопроводной воды, ppb

Элемент							
Pb	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
0,000998	0,016307	0,02086	0,566145	0,002775	0,142623	0,091741	0,450705

2.2 Описание условий проведения экспериментального исследования УНМ

Потенциальная возможность миграции углеродных наноматериалов с током природных вод (течения) значительно увеличивает шансы на распространение и доступность для человека, а соответственно, может представлять опасность для здоровья человека в глобальных масштабах. Отсутствие значений предельно допустимых концентраций в воде и «пробелы» в методах современной очистки для наночастиц, в том числе и углеродных, на фильтровальных станциях существенно повысит вероятность поступления такой воды в качестве питьевой по водопроводным сетям перорально к человеку.

Вероятные последствия употребления человеком данной воды в качестве питьевой были рассмотрены на биологической модели с использованием белых лабораторных крыс.

Работа с участием лабораторных животных проводилась при соблюдении принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации (1964), дополненной в 2004 году (Хельсинкская декларация… , 1964; Council Directive 86/609/EEC… , 1986).

Перед выполнением исследовательской работы животные содержались в одинаковых условиях. В течение 10 дней крысы находились на карантине, уход за животными осуществлялся в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977) (Приказ… № 755, 1977).

По истечении срока адаптации в первом блоке исследований оценивалось влияние углеродных нанотрубок. В эксперимент были включены 30 самцов лабораторных крыс возрастом 3–4 месяца, весом в среднем 180–200 г. Крысы были разбиты на три группы случайным образом, по 10 особей в каждой группе.

Две экспериментальные группы животных в течение 10 дней, один раз в сутки, получали в качестве питания МУНТ диаметром 8–10 нм и 18–20 нм в дозировке 500 мг/кг. Взвешивание навесок МУНТ проводилось на претенциозных весах Shimadzu AUX 220.

Навески МУНТ были смешаны с запаренным комбикормом («Фермикс-3-зерновой», дата выработки 09.09.2014) и сырым куриным яйцом. Сформированные пятиграммовые навески предлагались животным.

Контрольная группа крыс получала идентичные навески комбикорма, но без примеси углеродных нанотрубок.

Второй блок исследований проводился с целью проанализировать влияние углеродных нановолокон. В эксперименте принимали участие 60 самцов белых лабораторных крыс линии Wistar, возрастом 5–6 месяцев и весом 280–300 грамм. Дозировка оставалась прежней и составляла 500 мг/кг. Из общего числа подопытных крыс 30 маркированных животных участвовали в эксперименте в течение 10 дней, остальные 30 особей таким же образом участвовали в эксперименте, но уже в течение 14 дней, и использовались в дальнейшем для забора органов.

Подготовка к эксперименту и алгоритм проведения были идентичными, однако для опытных групп в субстрат из комбикорма в течение 10 - 14 дней добавлялись навески углеродных нановолокон: 56ОБР, КМ2-56БР.

Исследования показателей поведения осуществлялись на 1-й день эксперимента, после 3 дней и после 10 дней употребления наноматериалов, при стандартном освещении, в определенные часы (в 16.00).

2.3 Характеристика физиологических методов оценки поведения УНМ

В работе по изучению исследовательской активности и уровня тревожности лабораторных животных для получения объективных данных использовались распространенные поведенческие методики: тест «открытое поле», тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (Судаков и др., 2013).

2.3.1 Тест «открытое поле».

Методика «открытого поля» разработана К. Халлом (Hall, 1934). Арена «открытого поля» является стрессовой незнакомой средой для грызунов

(Бессалова, 2011) и основана на врожденном страхе открытых пространств. Она позволяет оценить ИА и уровень тревожности в условиях умеренного стресса (Яузина и др., 2013).

Тест оптимален в биолого-медицинских отраслях науки, доклинических исследованиях воздействий на нейроэндокринную систему (Буслович и др., 1989; Бессалова, 2011).

«Открытое поле» представляло собой арену размером (100×100) см, поделенную на 25 квадратов с 16 норковыми отверстиями, распределенными в пересечениях квадратов. Изображение «открытого поля» представлено на рисунке 4.

Рисунок 4. Тест «открытое поле»

Меченое животное помещалось на стартовую площадку, расположенную в центре поля размером (20×20) см. Длительность тестирования составляла 3 мин. После каждого тестирования площадка «открытого поля» промывалась и высушивалась во избежание появления запаха животного.

Оценка количественных показателей исследовательской активности и тревожности крыс в тесте «открытого поля» производилась по шкале, заимствованной у Т.А. Баталовой (Баталова, 2011).

2.3.2 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».

«Крестообразный лабиринт» (Pellow et al., 1985) считается универсальным методом оценки исследовательской активности и тревожности у грызунов. В основе данной методики лежит врожденный страх открытых пространств, высоты у крыс и безусловно-рефлекторное исследовательское поведение в неизвестной ранее обстановке (Григорьев и др., 2006; Баталова, 2011; Яузина, 2013).

Архитектоника ПКЛ, а именно система открытых и закрытых рукавов, позволяет объективно оценивать тревожность. Интерпретировать свешивания с открытых рукавов можно как прогноз рисков перед принятием решения (страх высоты и страх открытых пространств), стойки, так же как и в «открытом поле», рассматриваются как элемент ИА (Левандовская и др., 2013).

Установка представлена закрытыми и открытыми рукавами. Длина рукавов 90 см, высота лабиринта 77 см. Изображение ПКЛ представлено на рисунке 5.

Рисунок 5. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

Меченое животное помещали в центр, и в течение 3 мин снимали на видеокамеру поведение животного. После каждого тестирования обработка лабиринта осуществлялась, как и в методике «открытого поля».

Количественная оценка показателей осуществлялась по данным Т.А. Баталовой (Баталова, 2011).

2.3.3 Универсальная проблемная камера Н.Р. Григорьева.

Поисковая активность и когнитивные способности крыс оценивались в универсальной проблемной камере (УПК), разработанной на кафедре физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» д.м.н., профессором Н.Р. Григорьевым (Пат. 2432902).

УПК заставляет крыс искать новое решение проблемы в условиях информационно-эмоционального стресса при блокировке использованных выходов. Полная адаптивность ПА рассматривается при правильном выборе всех 6 выходов, безошибочно (Григорьев, 1996; 1998).

Проблемная камера представлена шестигранником со съемной крышкой для возможности помещения группы крыс в камеру при выработке инструментальных рефлексов. В крышке имеется входной люк с заслонкой для индивидуальной посадки животного, препятствующей выходу животного через данное отверстие. Глубина УПК равна 9 см, что обеспечивает только горизонтальную локомоторную активность подопытного животного. В боковых стенках УПК располагаются шесть выходов, закрывающихся с внешней стороны дверками. Дверки снабжены темными заслонками для блокировки выхода после успешной побежки. Светодиод дверок срабатывает при непосредственном контакте с головой или лапами грызуна, что и оценивается для подсчета правильных и ошибочных побежек (Пат. 2432902). Изображение УПК представлено на рисунке 6.

Перед основным исследованием в период карантина крысы подвергались выработке инструментального пищедобывательного рефлекса в течение 3 дней. Подкрепление (доминирующая мотивация) было в виде жареных хлебных сухарей, располагающихся за пределами ПК. Депривация пищей составляла 24 часа.

Изучение поисковой активности и когнитивных способностей крыс проводились в те же сроки, что и другие поведенческие методики, на фоне эмоционально-информационного стресса.

Рисунок 6. Выработка инструментального пищедобывательного поведения у крыс в универсальной проблемной камере

Крыса помещалась через верхнее отверстие в камеру. После совершения побежки дверца блокировалась, и выход через нее уже был невозможен. Перед животным ставилась когнитивная задача – найти новый выход. Правильными считались побежки к каждой новой дверке. Ошибочные же определялись по количеству попыток выхода через блокированные дверцы. В эксперименте не допускалась постановка тупиковой когнитивной задачи в виде блокировки всех шести выходов.

Когнитивный показатель (КП) высчитывался согласно пропорции: сумма правильных и неправильных побежек приравнивалась к 100%, а число правильных составляло процентное выражение когнитивных способностей.

Мотивационно-энергетические показатели на этапе принятия решения определялись по интенсивности поиска (число целенаправленных побежек) и времени поиска, оцениваемом в секундах. Время тестирования каждой особи составляло 3 минуты.

Полученные результаты опытных групп подвергались статистическому сравнению с контрольными группами и оценивались непараметрическим методом статистической обработки с использованием критерия *U* Манна – Уитни, средняя

арифметическая и ее отклонение вычислялись с помощью критерия Стьюдента в программе STATISTICA 6.1.

2.4 Характеристика методов определения биохимических показателей крови

Животные выводились из эксперимента после наркотизации внутримышечной инъекцией 0,5%-го раствора кетамина.

Определение церулоплазмина в сыворотке крови, осуществляли методом окисления р-фенилендиамина при участии церулоплазмина (Колб и др., 1976). Количественное выражение в мг/100мл.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) определяли в цельной крови по цветной реакции с ТБК (Бородин, Арчаков, 1987). Содержание МДА выражали в нмолях /мл крови.

Определение содержания диеновых конъюгатов с помощью спектрофотометра СФ-160. Для пересчета использовали коэффициент мольной экстинции $2,2*10^{-5}$ $М^{-5}см^{-5}$ (Стальная, 1977). Величину диеновых конъюгатов выражали в нмолях на 1 мл плазмы крови.

Определение содержания гидроперекисей липидов определяли на основе их способности окислять ионы Fe^{2+} с последующей реакцией на Fe^{3+} с тиоцианатом аммония (Романова, Стальная, 1977). Величину гидроперекисей выражали в нмолях/ мл крови.

Содержание витамина Е определяли в липидных экстрактах из крови по цветной реакции с дипиридилом и $FeCl_3$. Выражали в мкг/мл.

Определение цитокинов осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), используя аппаратуру фирмы Biochrom, UK и диагностикумы ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

2.5 Характеристика морфологических методов исследования

После экспериментальных воздействий эвтаназия животных производилась путем внутримышечного введения 0,5 мл 5%-го раствора кетамина, согласно требованиям приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организованных форм работы с использованием экспериментальных животных» (Приказ… № 755, 1977). Взятие материала осуществлялось после наступления наркотического эффекта – отбирались образцы желудочно-кишечного тракта и ткань головного мозга крыс.

Гистологичесские образцы органов желудочно-кишечного тракта крыс фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном растворе формалина («БиоВитрум», Россия), затем производилась заливка парафином «Histomix Extra» («БиоВитрум», Россия). Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, препараты проводились через абсолютный спирт и заключались в нейтральный канадский бальзам.

Для гистологического исследования головного мозга по методу Ниссля препараты фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном формалине («БиоВитрум», Россия), заливка осуществлялась парафином «Histomix Extra» («БиоВитрум», Россия). Парафиновые срезы выдерживали при температуре 37 С в 70%-м спирте. Срезы окрашивали в растворе толуидинового синего (0,1%). Окраску дифференцировали в 70–96%-м спирте. Препараты проводились через абсолютный спирт и заключались в нейтральный канадский бальзам. Препараты изучались под световым микроскопом “Zeiss Axio Observer A1” (Zeiss, Германия), фотосъемка “Axio Cam 3” (Zeiss, Германия), использовалась программа компьютерной морфометрии «AxioVision 4.2».

2.6 Характеристика математических методов анализа полученных данных

Полученные результаты исследования опытных групп подвергались статистическому сравнению с данными контрольных групп и оценивались

непараметрическим методом статистической обработки с использованием критерия U Манна – Уитни, $M \pm m$ рассчитывалось с помощью t-критерия в программе STATISTICA 6.1.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И «ПОВЕДЕНИЯ» НАНОМАТЕРИАЛОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ, А ТАКЖЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ

3.1 Раман-спектроскопия углеродных наноматериалов

Исследование УНВ с помощью Раман-спектроскопии показало, что сдвиг сигнала *D*-пика с 1299 см$^{-1}$ и *G*-пика с 1953 см$^{-1}$ до 1313 см$^{-1}$ и 1598 см$^{-1}$ у УНВ (КМ2-56БР) свидетельствует об увеличении количества упорядоченных связей и уменьшении количества дефектов (см. рисунок 7). В то же время увеличение интенсивности сигнала: 1313 см$^{-1}$, по отношению к сигналу 1598 см$^{-1}$, – свидетельствует о многослойности упорядоченной структуры.

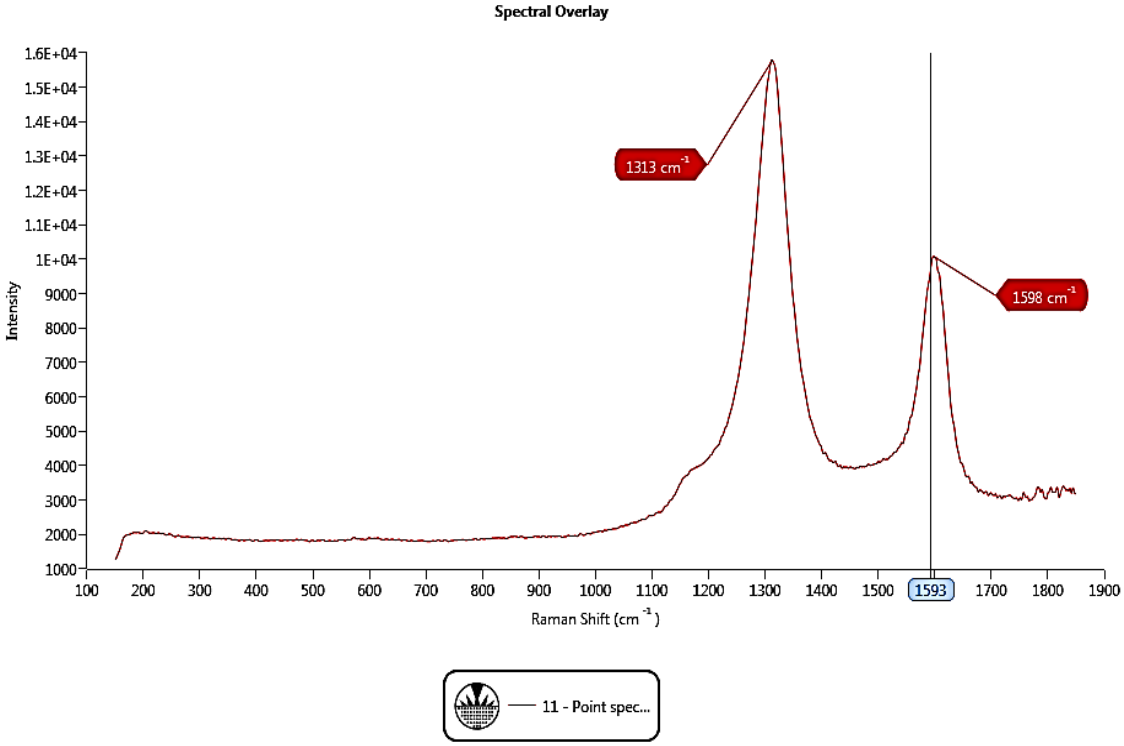


Рисунок 7. Рамановский спектр УНВ-2

У УНВ (56ОБР) сохраняется сдвиг *D*- и *G*-сигналов, но при этом уменьшается соотношение их интенсивностей. Это свидетельствует о том, что

они также имеют упорядоченную структуру, но их диаметр меньше, чем у УНВ-2 (см. рисунок 8).

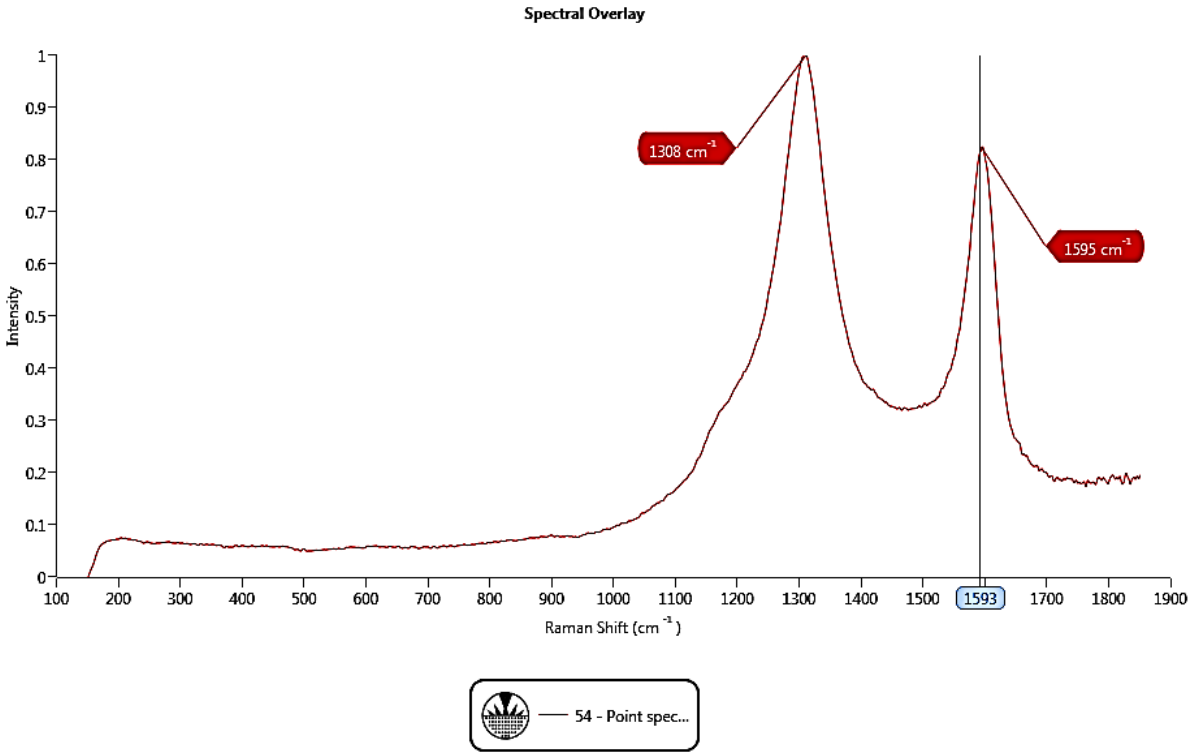


Рисунок 8. Рамановский спектр УНВ-1

Исследование МУНТ с помощью Раман-спектроскопии показало, что МУНТ-1 имеет наиболее интенсивный *D*-пик (1305 см$^{-1}$). Этот образец имеет наименьшее количество нанотрубок без дефектов (рисунок 9).

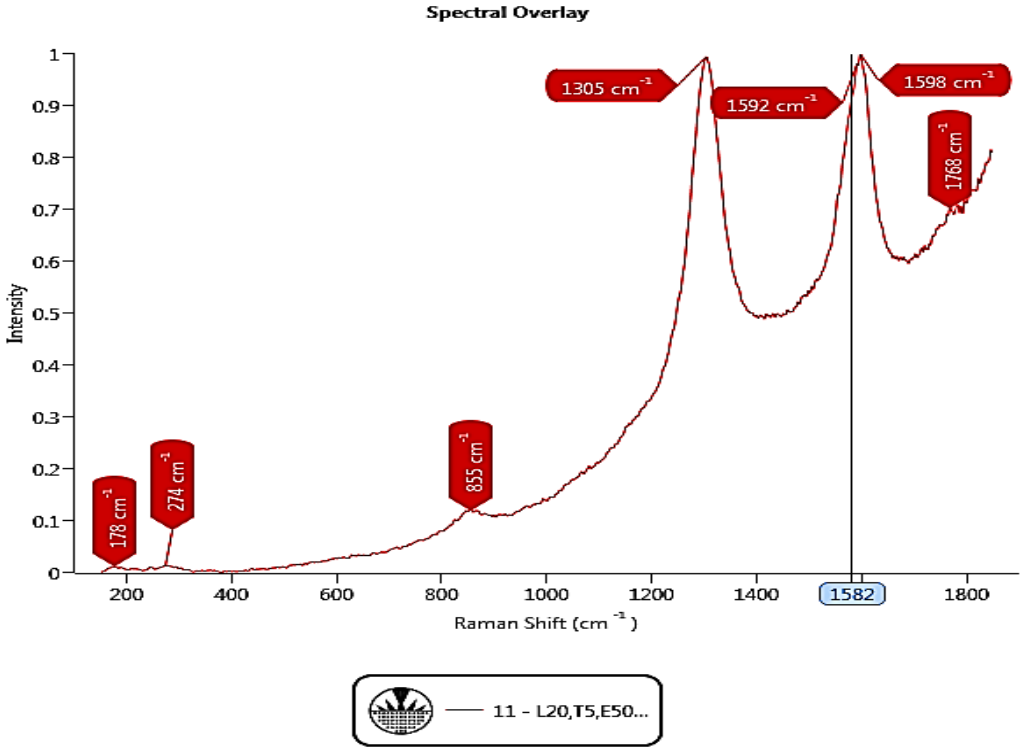


Рисунок 9. Рамановский спектр МУНТ-1

Отсутствие пиков в области радиальных дыхательных мод (РДМ) более 274 см$^{-1}$ свидетельствует о том, что большая часть трубок имеет диаметр менее 8 нм. Пик при 855 см$^{-1}$ также свидетельствует о симметрии нанотрубок (8 – 8), (9 – 9), (10 – 10), (11 – 11), которые обладают выраженными металлическими свойствами (Osipov et al., 2011).

МУНТ-2 характеризуется менее упорядоченной структурой. *D*-пик (1308 см$^{-1}$) относится к беспорядочной структуре или дефектам в трубках, а также возникает из краевых конфигураций в графене, где нарушается конфигурация плоского листа (рисунок 10).

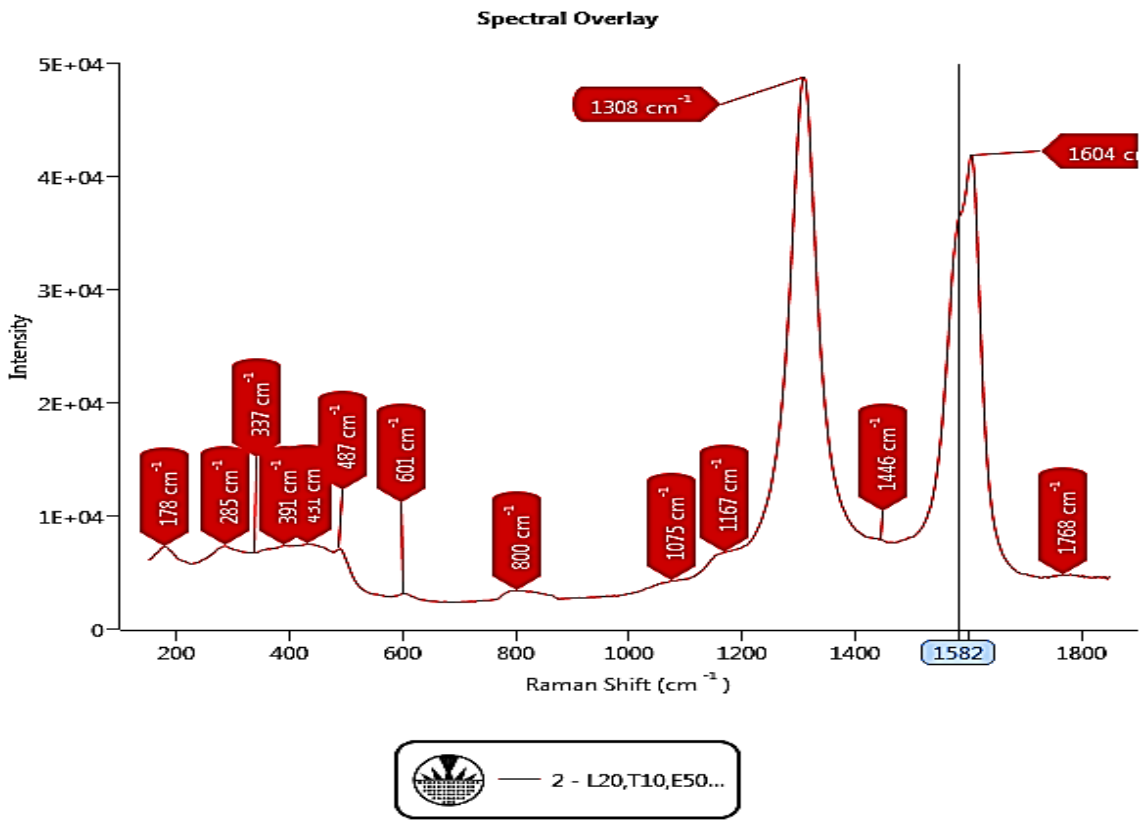


Рисунок 10. Рамановский спектр МУНТ-2

Он проявляется на краю открытого конца углеродной нанотрубки, где расположены дефекты. Иногда также может наблюдаться некоторый sp2-связанный аморфный углерод, вносящий вклад в эту полосу. Линия на уровне 1605 см$^{-1}$, соответствующая G^{+}-полосе, также является показателем для связанного с sp2 углерода, который представляет собой поверхностные дефектные моды. Большое количество пиков в области радиальных РДМ в низкочастотной области спектра (пики при 178 см$^{-1}$, 278 см$^{-1}$, 337 см$^{-1}$, 487 см$^{-1}$) тоже указывает на большое число нанотрубок в образце, имеющем двойной слой (Costa et al., 2008).

Анализ результатов исследования поведения агрегатов УНМ в воде, полученных нами по итогам проведения Раман-спектроскопии, позволил выявить следующее.

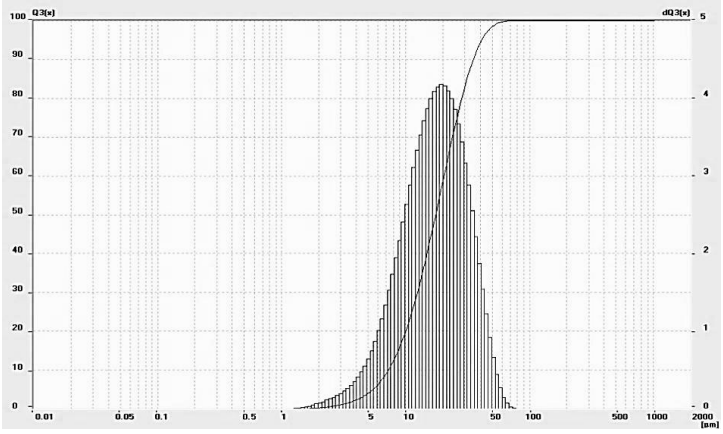
Согласно рамановской спектрометрии, поверхность УНВ упорядочена и представлена кристаллическим углеродом, который, бесспорно, гидрофобен, в отличие от аморфного. Как известно, частицы оседают, когда имеют малую

удельную поверхность и плотность частицы больше плотности воды. Следовательно, разволокнение приводит к увеличению удельной поверхности, компактизация частиц уменьшается и в совокупности с гидрофобностью кристаллического углерода позволяет частицам оставаться во взвешенном состоянии.

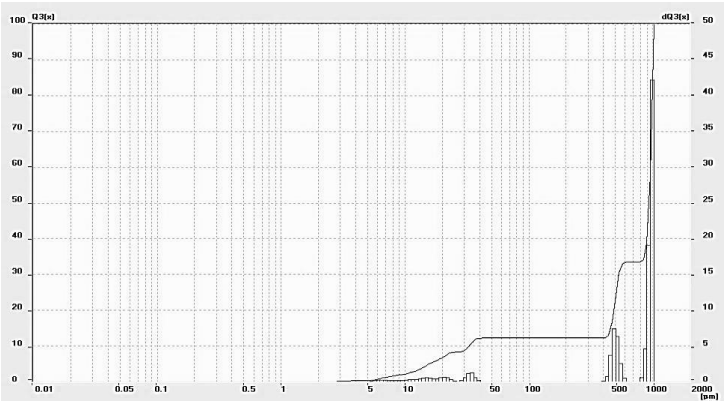
3.2 «Поведение» углеродных нановолокон в водопроводной воде

3.2.1 Углеродные нановолокна (УНВ).

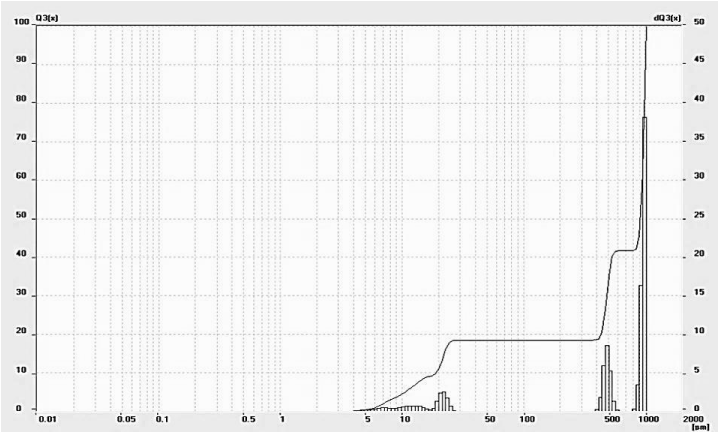
После обработки УНВ-1 и УНВ-2 ультразвуком мощностью 10 Вт и 100 Вт наблюдалось увеличение размера агрегатов (от 5–50 до 500–1000 мкм) (см. рисунки 11 и 12).



а



б

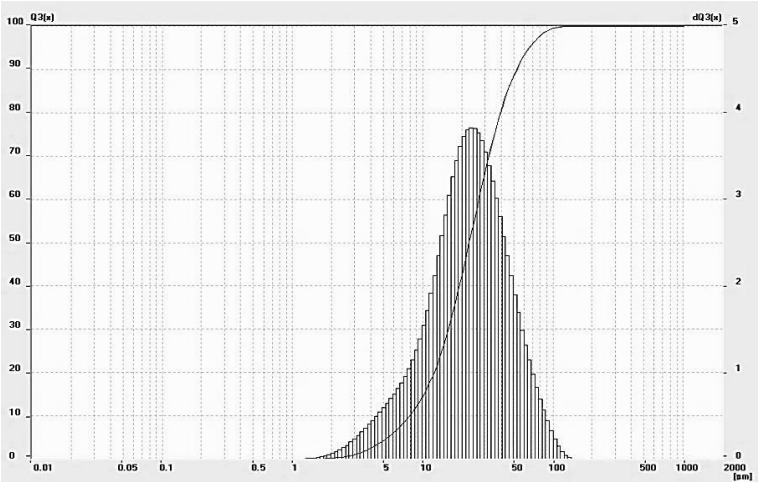


в

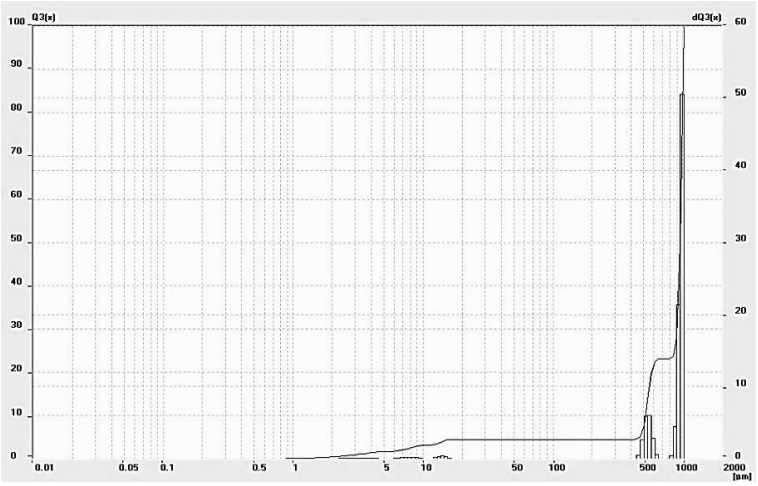
Рисунок 11 – УНВ (КМ2-56БР): *а* – до УЗ-диспергирования;

б – после УЗ-диспергирования мощностью 10 Вт (слабое течение);

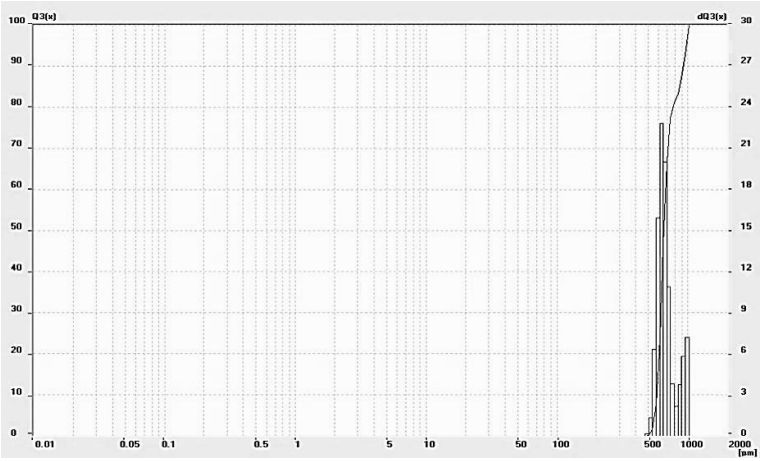
в – после УЗ-диспергирования мощностью 100 Вт (сильное течение)



а



б



в

Рисунок 12. УНВ (56ОБР): *а* – до УЗ-диспергирования;

б – после УЗ-диспергирования мощностью 10 Вт (слабое течение);

в – после УЗ-диспергирования мощностью 100 Вт (сильное течение)

На основании этих данных мы можем предполагать, что разные УНМ могут оказывать и различные эффекты на организмы: в частности, образование крупных агрегатов может вызывать невысокую токсическую активность УНВ, которые, скорее всего, должны транзиторно проходить через желудочно-кишечный тракт крыс.

3.3 Исследование осаждения углеродных наноматериалов

3.3.1 Исследование осаждения многослойных углеродных нанотрубок.

На рисунках 13 и 14 представлена зависимость величины светопоглощения МУНТ-1 и МУНТ-2 от времени соответственно.

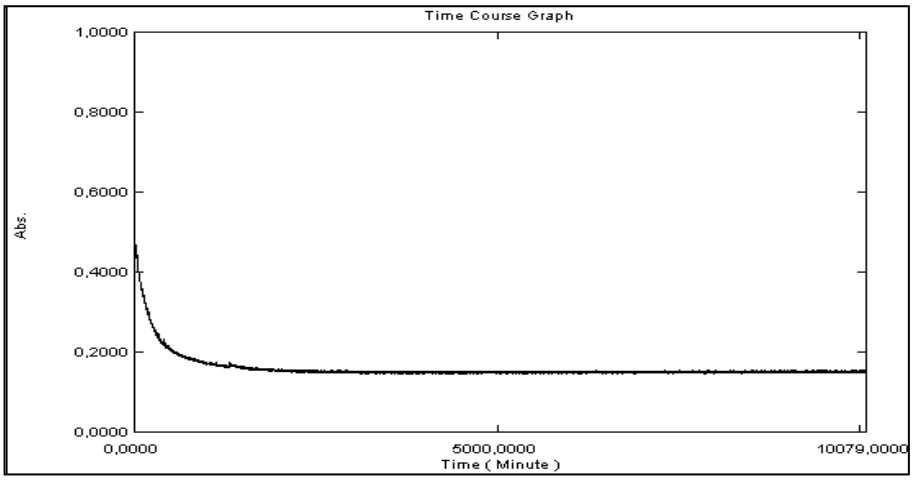


Рисунок 13. График светопоглощения раствора МУНТ-1 при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10 800 мин)

На основании полученных данных можно отметить, что скорость осаждения МУНТ-1 выше, чем МУНТ-2, – это позволяет нам сделать вывод о наличии некоторых факторов, влияющих на осаждение МУНТ.

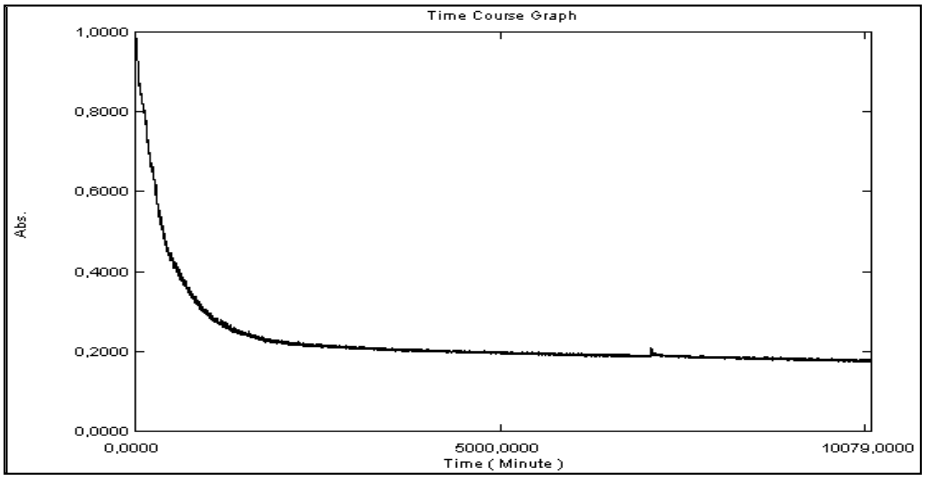


Рисунок 14. График светопоглощения раствора МУНТ-2 при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10 800 мин)

Такое поведение МУНТ объясняется тем, что, с учетом размеров частиц, система «водопроводная вода – МУНТ» является коллоидной. В образцах МУНТ встречаются такие примеси, как Fe, Co, Al, вследствие чего на поверхности коллоидных частиц присутствуют валентные электроны.

В ходе эксперимента по поведению МУНТ в воде были установлены факторы, влияющие на скорость агрегации и оседания частиц: так, наибольший вклад, по нашему мнению, вносят размер частиц и наличие примесей.

МУНТ-1 оседают быстрее МУНТ-2 за счет более ускоренной агрегации. Обусловлено это тем, что они имеют большую площадь удельной активной поверхности и большую массовую долю примесей металлов, источников неспаренных электронов, тем самым, быстрее адсорбируются ионы OH^- и H_3O^+ .

3.3.2 Исследование осаждения углеродных нановолокон.

В ходе работы нами было произведено исследование характера осаждения двух типов УНВ (см. рисунки 15 и 16).

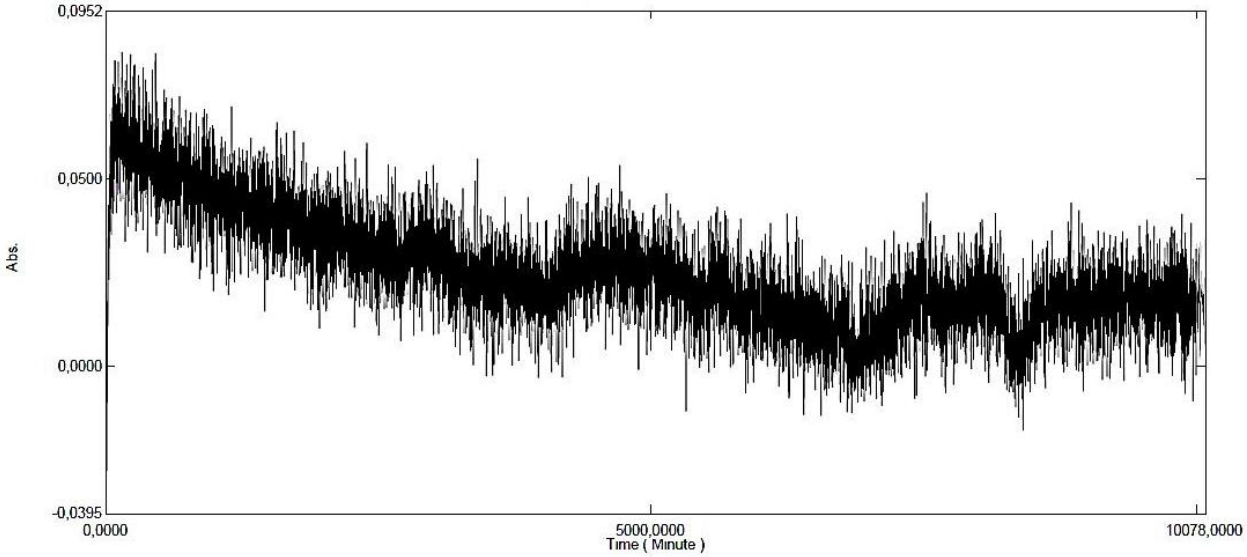


Рисунок 15. График светопоглощения раствора УНВ (КМ2-56БР) при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10 800 точек)

Как видно, углеродные нановолокна за неделю нахождения во взвеси в водопроводной воде полностью не оседают; часть из них продолжает находиться во взвеси, что является фактором экологической их опасности. Причина долгого нахождения во взвешенном состоянии объясняется разволокнением крупных агрегатов и их гидрофобностью.

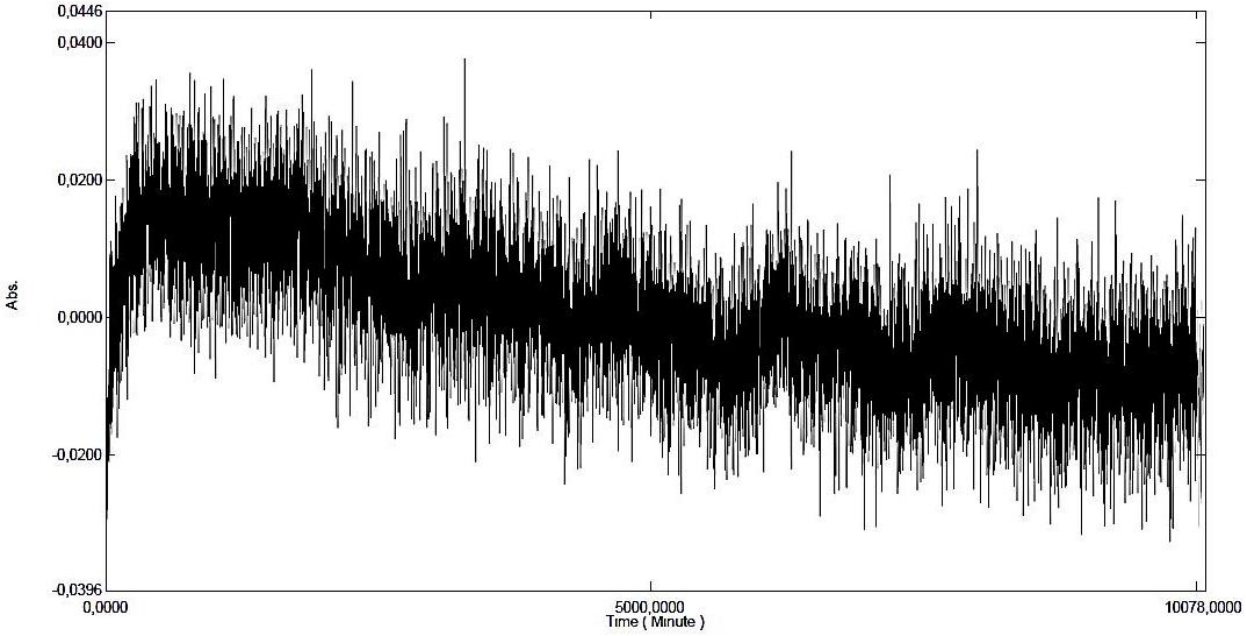


Рисунок 16. График светопоглощения раствора УНВ (56ОБР) при длине волны 195 нм в зависимости от времени (10 800 точек)

УНМ, как синтетические материалы, которые отсутствуют в живой природе, тяжело разлагаются в естественных условиях, поэтому опасность попадания последних в любую среду не утрачивает своей значимости.

Из научной литературы стало известно, что токсические вещества могут негативно сказываться на биоценозе водоемов, нарушая процессы фотосинтеза вследствие препятствования прохождению солнечного света (Ильинский, Аношин, 2011), тем самым негативно воздействуя на фитопланктон и макрофиты. Отмечается уничтожающая роль загрязняющих веществ для естественных фильтраторов (Тутурова, 2016).

Если проследить путь миграции УНМ в водной среде, то очевидно, что единичные УНМ способны поступать в организмы гидробионтов, которые находятся в толще воды: планктон, бентос, рыбу. Большая часть УНМ в виде агрегатов опускается на дно и может становиться объектом для поглощения основными фильтраторами. Способность организмов, находящихся в основании экологической пирамиды, кумулировать загрязнители, в том числе и УНМ, увеличивает риски передачи высшим животным по пищевым цепям.

В результате проведенных экспериментов с искусственным течением нами установлено, что перемешивание (имитация при помощи ультразвука) приводит к формированию крупных агрегатов. По-видимому, возникновение «завихрений» при ультразвуковой кавитации приводит к появлению пузырьков воздуха в воде, которые стабилизируются отдельными УНВ.

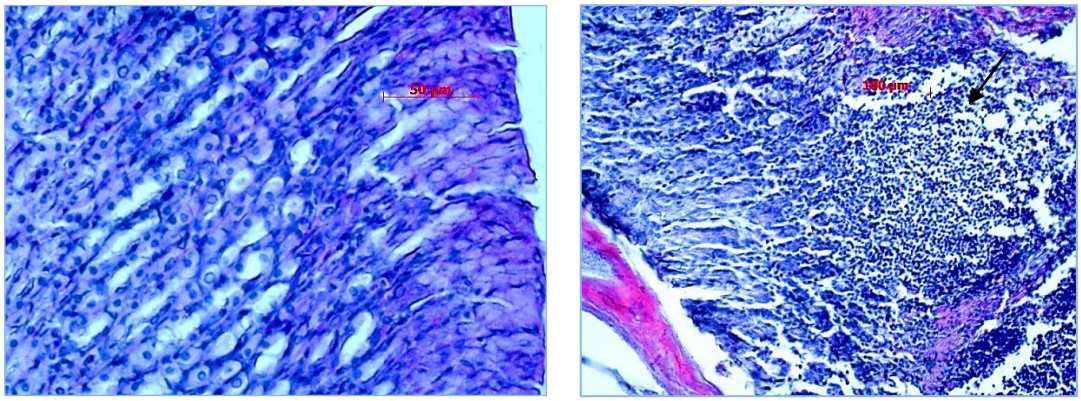
В ходе экспериментов по исследованию «поведения» углеродных нанотрубок в водопроводной воде в процессе моделирования техногенной катастрофы были установлены факторы, влияющие на скорость агрегации и оседания частиц. Обусловлено это тем, что на их поверхности, содержащей бóльшее количество неорганических веществ, быстрее адсорбируются ионы OH^- и H_3O^+ и происходит образование двойного электрического слоя. Мы можем объяснить это явление с помощью теории ДЛФО (*сокр.* теория Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека) и «расклинивающего давления», влияющего на агрегативную устойчивость. Уменьшение расклинивающего давления под влиянием ионов коагуляторов, снижается устойчивость, что приводит к коагуляции частиц и седиментации.

3.4 Морфологические изменения в организме крыс, вызванные наноматериалами

3.4.1 Морфологическая оценка влияния углеродных нановолокон на органы пищеварения и ткани головного мозга крыс при пероральном введении.

При световой микроскопии гистологического строения стенки желудка (см. рисунок 17, *а* и *б*) установлен ряд отличий между данными контрольной группы и экспериментальных групп животных, получавших с кормом УНВ:

– В целом, у крыс в экспериментальных группах, получавших УНВ-1 и УНВ-2 наблюдается утолщение слизистой оболочки желудка, по сравнению с контрольной группой, в связи с механическим раздражением УНВ.



а б

Рисунок 17. Гистологическое строение слизистой стенки желудка у крыс при введении УНВ разных типов: *а* – желудок крысы в эксперементальной группе с использованием УНВ-2 (в поверхностном слое слизистой желудка отсутствуют ядра, граница клеток стерта; окраска гематоксилин-эозином); *б* – желудок крысы опытной группы с использованием УНВ-1 (крупный лимфоидный фолликул; окраска гематоксилин-эозином). Увеличение: *а* – ×400, *б* – ×200

– В группе крыс употреблявших УНВ-2, в поверхностных слоях слизистой оболочки отмечаются дистрофические изменения и некрозы, ядра не прослеживаются, границы клеток стерты.

– У животных, получавших с питанием УНВ-1 в подслизистой оболочке желудка видны множественные лимфоидные фолликулы.

– Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах достоверно не отличаются друг от друга (таблица 5).

Таблица 5

Морфометрические параметры эпителиоцитов желудка в экспериментальных группах (мкм)

Типы вводимых крысам УНВ	Длина ядра	Ширина ядра	Площадь ядра
Контроль	5,11±0,46	4,46±0,46	16,29±2,58
УНВ-1	5,49±0,61	4,73±0,53	18,59±3,51
УНВ-2	5,41±0,60	4,69±0,56	18,62±3,17

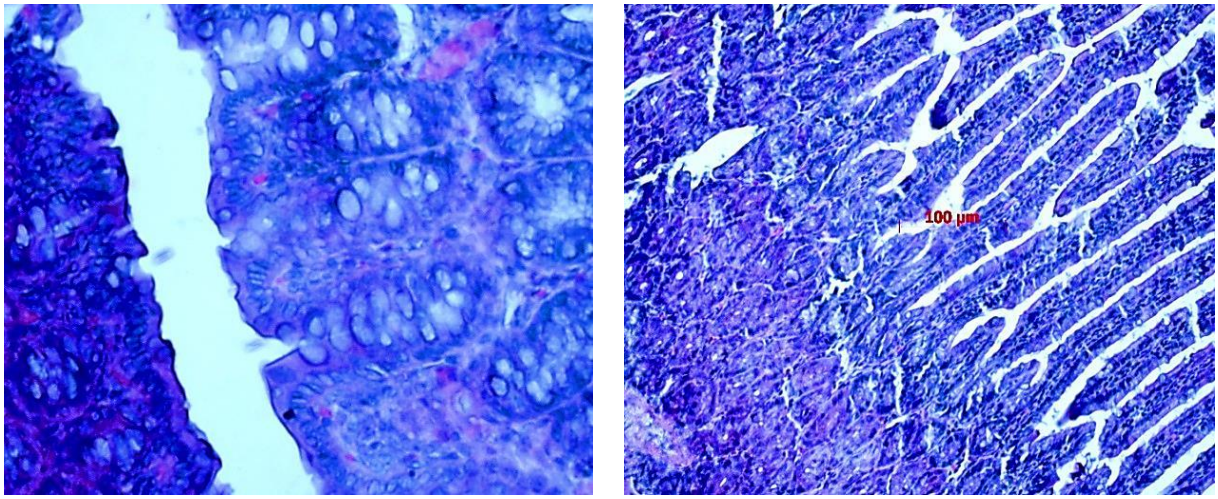
Окончание таблицы 5

Типы вводимых крысам УНВ	Длина клетки	Ширина клетки	Площадь клетки
Контроль	11,55±1,50	9,05±1,46	69,47±14,74
УНВ-1	12,18±1,31	9,76±1,04	78,95±14.61
УНВ-2	12,22±1,37	10,24±1,31	85,05±15,24
Примечания – 1. Изменения признака статистически значимы. 2. «*» – $p < 0,05$.			

При световой микроскопии в гистологическом строении кишечника у крыс выявлен ряд отличий между данными экспериментальных групп (см. рисунок 18, *а* и *б*) и контрольной:

– В слизистой оболочке кишечника в экспериментальных группах, употреблявших УНВ-1 и УНВ-2 наблюдается выраженное слизеобразование.

– В эпителии – множество бокаловидных клеток с заполненными слизью вакуолями. Сосуды полнокровны.



а б

Рисунок 18. Гистологическое строение стенки тонкого кишечника у крыс при введении УНВ разных типов: *а* – кишечник крысы, получавшей УНВ - (КМ2-56БР, (отмечается множество вакуолей; окраска гематоксилин-эозином); *б* – кишечник крысы, подвергшейся экспозиции УНВ - 56ОБР, (отмечается

множество вакуолей; окраска гематоксилин-эозином). Увеличение: *а* – ×400; *б* – ×200

– В обеих экспериментальных группах в подслизистом слое кишечника отмечается гипертрофия лимфоидных фолликулов. Других патологических изменений не обнаружено.

– Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника при введении УНВ и в контрольной группе достоверно практически не отличаются друг от друга (таблица 6).

Таблица 6

Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника в экспериментальных группах животных (мкм)

Типы вводимых крысам УНВ	Длина ядра	Ширина ядра	Площадь ядра
Контроль	4,96±0,66	3,81±0,65	12,84±2,86
УНВ-1	5,36±0,74	4,10±0,70	15,15±2,56
УНВ-2	5,63±1,07	4,12±0,85	16,00±3,70

Окончание таблицы 6

Типы вводимых крысам УНВ	Длина клетки	Ширина клетки	Площадь клетки
Контроль	14,34±2,97	8,64±2,28	60,67±14,70
УНВ-1	14,70±1,60	5,77±0,57	68,16±5,56
УНВ-2	16,50±2,10	7,25±1,52	76,71±11,13
Примечание – 1. Изменения признака статистически значимы. 2. «*» – $p < 0,05$.			

На основании полученных результатов можно проследить влияние различных типов УНВ на гистологическое строение органов пищеварения при их пероральном введении:

– Подслизистая и серозная оболочка желудка, гладкая мускулатура во всех группах подопытных животных – без патологических изменений; однако во всех экспериментальных группах животных, получавших с питанием (УНВ-1 и УНВ-2) наблюдается утолщение в слизистой оболочке, по сравнению с контрольной группой.

– В связи с механическим раздражением нановолокнами в кишечнике у крыс всех экспериментальных групп обнаружено множество бокаловидных клеток с заполненными слизью вакуолями, – как следствие, наблюдаются выраженное слизеобразование, полнокровность сосудов.

В настоящей работе было исследовано влияние перорального введения УНВ на ткань мозга крыс. Нами было выдвинуто предположение об общем токсическом действии углеродных наноматериалов, которое могло отразиться на поведенческих функциях подопытных животных:

– На этом этапе у крыс в контрольной группе отмечено нормальное гистологическое строение ткани мозга (см. рисунки 19 и 20).

– Мягкая мозговая оболочка у животных контрольной группы – без повреждений, отека, инфильтрации и кровоизлияний.

– Сосуды мягкой мозговой оболочки – нормального кровенаполнения.

– Гистоархитектоника коры головного мозга сохраняется, прослеживаются слои. Признаков повреждения коры головного мозга (некроз, кровоизлияния, воспалительная инфильтрация, отек) не обнаружено.

– Белое вещество головного мозга у крыс в контрольной группе также без изменений (см. рисунок 20).

– Миелоархитектоника белого вещества головного мозга у крыс в контрольной группе без изменений. Признаков повреждения нейроглии, периваскулярного отека, воспаления и кровоизлияний не обнаружено.

– Сосуды головного мозга – нормального кровенаполнения.

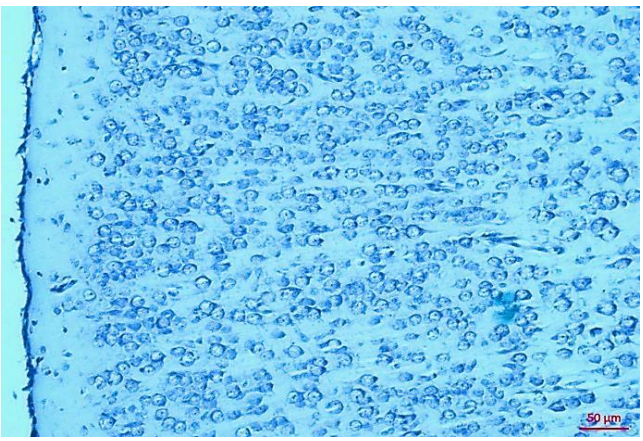


Рисунок 19. Гистологическое строение коры мозга (серое вещество) с мягкой мозговой оболочкой у крыс в контрольной группе. Окраска по методу Ниссля. Увеличение ×200

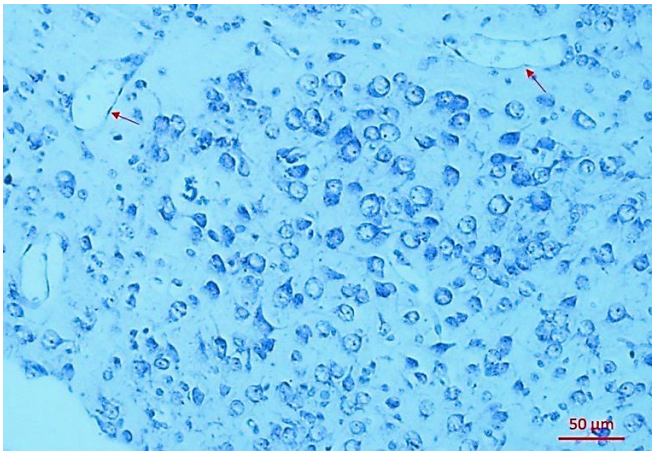


Рисунок 20. Гистологическое строение белого вещества головного мозга с сосудами у крыс в контрольной группе. Окраска по методу Ниссля. Увеличение ×200

В экспериментальных группах, в которых крысы получали УНВ-2 (рисунок 21) и УНВ-1 (см. рисунок 22), отличий от данных контрольной группы обнаружено не было:

– Не наблюдалось изменений в строении белого и серого вещества головного мозга.

– Мягкая мозговая оболочка и кора мозга у крыс в группе, употреблявших УНВ-2 без повреждений, отека, инфильтрации и кровоизлияний. Сосуды мягкой мозговой оболочки нормального кровенаполнения.

– Гистоархитектоника коры головного мозга сохранена, прослеживаются слои.

– Миелоархитектоника белого вещества мозга у крыс получавших УНВ-1 сохранена. Признаков повреждения нейроглии нет (см. рисунок 22).

– Микрососуды головного мозга полнокровны. Признаков периваскулярного отека, воспаления и кровоизлияний не обнаружено.

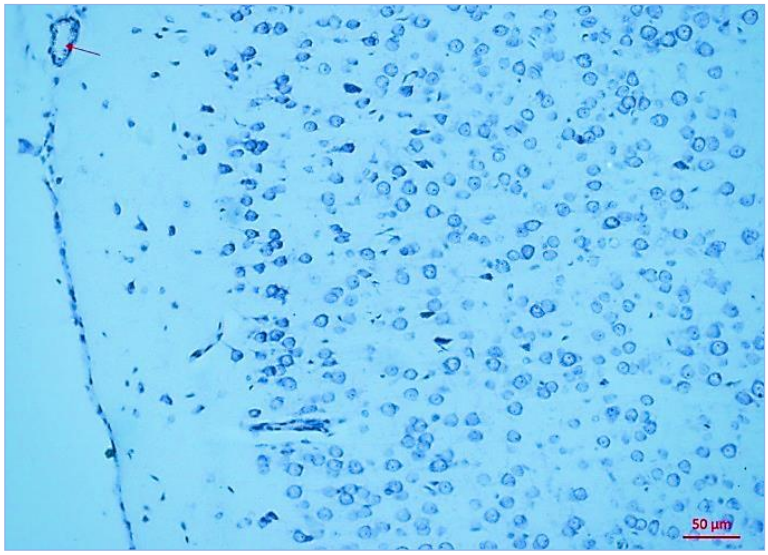


Рисунок 21. Гистологическое строение коры мозга (серое вещество) с мягкой мозговой оболочкой у крыс в группе с использованием УНВ-2. Окраска по методу Ниссля. Увеличение ×200

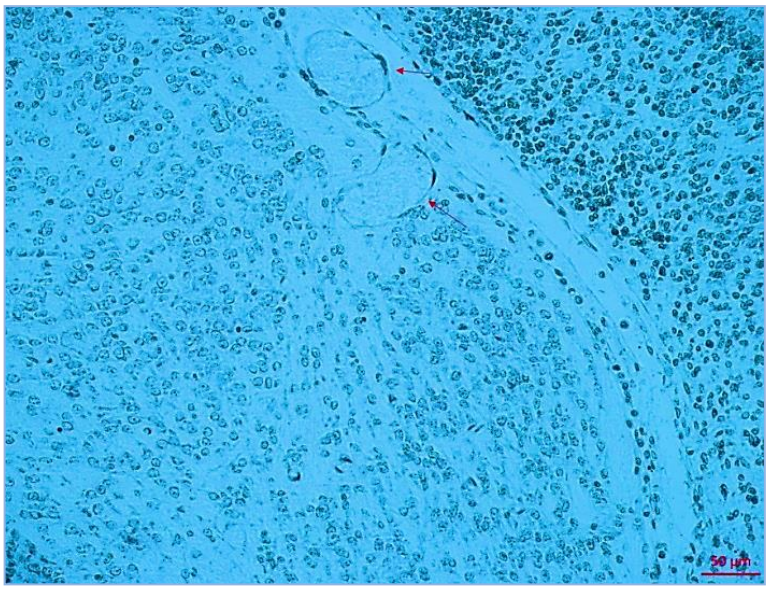


Рисунок 22. Гистологическое строение белого вещества головного мозга с сосудами у крыс в группе с использованием УНВ-1. Окраска по методу Ниссля. Увеличение ×200

Развитие воспалительных процессов подтверждается гистологическими данными органов ЖКТ. В слизистой кишечника выявлено повышение слизеобразования как результат механического раздражения инородными агентами, что согласуется с данными других авторов о том, что крупные агломераты нановолокон (в нашем случае размеры составляли средний диаметр 85 нм, длиной 5–50 мкм) способны вызывать механические повреждения клеток выступающими волокнами (Голохваст и др., 2013а).

3.5 Исследование влияния углеродных наноматериалов на поведенческие показатели

3.5.1 Исследование влияния углеродных нанотрубок.

В первом блоке оценивалось влияние нанотрубок диаметром 8–10 нм и 18–20 нм на поведенческие показатели в тестах «открытое поле» (ОП), ПКЛ и УПК.

Выявленные количественные показатели исследовательской активности в «открытом поле» представлены в сводной таблице 7.

В группе-1, где крысы получали с питанием МУНТ-1 общее время двигательной активности уменьшилось к 3-му дню – на 45%, а к 10-му – на 79% ($p < 0,01$). В группе животных -2, употреблявших МУНТ-2 уменьшение общего времени двигательной активности в 3-й и 10-й дни составило 74% ($p < 0,05$) и 77% ($p < 0,05$) соответственно. В контрольной группе уменьшение в эти дни составило 27% и 30% соответственно.

Таблица 7

Показатели ориентировочно-исследовательской активности в группах

Показатели ($M \pm m$)	Контрольная группа		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Латентное время	-0,55±0,29	-0,15±0,16	-0,40±0,27
Общее время двигательной активности	8,07±1,43	5,87±1,23	5,60±1,13
Пересечение внутренних квадратов поля	11,00±2,34	15,40±2,76	25,60±5,68
Пересечения внешних квадратов	24,40±3,19	28,20±7,80	22,70±4,98
Число заглядываний в норки	6,10±1,58	4,50±1,29	8,20±1,77
Количество вертикальных стоек	8,20±3,15	12,20±4,58	14,60±4,72

Продолжение таблицы 7

Показатели ($M \pm m$)	Группа -1 с использованием МУНТ-1		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Латентное время	-0,20±0,21	0,00±0,00	-0,20±0,21
Общее время двигательной активности	5,97±1,18	3,28±0,85	1,25±0,41**
Пересечение внутренних квадратов поля	9,00±3,59	10,00±2,79	3,80±1,06***
Пересечения внешних квадратов	25,40±5,47	14,20±5,01	6,80±2,46**
Число заглядываний в норки	3,70±1,02	4,30±1,55	2,10±0,46*
Количество вертикальных стоек	16,20±2,48	4,40±1,66	2,20±1,27**

Окончание таблицы 7

Показатели ($M \pm m$)	Группа -2 с использованием МУНТ-2		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Латентное время	-0,10±0,10	-0,60±0,58	-0,25±0,18
Общее время двигательной активности	7,91±1,65	2,04±0,70*	1,85±0,68*
Пересечение внутренних квадратов поля	19,20±6,65	8,00±2,08*	5,00±1,81**
Пересечения внешних квадратов	33,90±7,92	8,50±4,52**	5,50±3,05**
Число заглядываний в норки	3,90±0,87	3,70±1,10	3,30±1,20*
Количество вертикальных стоек	19,40±4,01	3,60±1,96	4,20±2,50**
Примечание – «*» – при $p < 0,05$, «**» – при $p < 0,01$.			

Изменения в пересечении внутренних квадратов поля в контрольной группе имеют положительную динамику. Увеличение к 3-му и 10-му дню составило 40% и 133% соответственно. В экспериментальных группах наблюдалось уменьшение данного показателя. В группе -1 показатель уменьшился на 58% ($p < 0,001$) к 10-му дню, а к 3-му дню наблюдалось незначительное увеличение пересечений внутренних квадратов на 11%. В группе -2 статистические изменения в данном показателе зафиксированы уже на 3-й день. Уменьшения на 3-й и 10-й дни составили 58% ($p < 0,05$) и 74% ($p < 0,01$) соответственно.

Уменьшение пересечения внешних квадратов в опытных группах определялось уже на 3-й день. В группе -1 снижение составило 44%, а в группе - 2 – 75% ($p < 0,01$). На 10-й день изменения в обеих экспериментальных группах имели статистические значимые показатели. Уменьшение в группах-1 и -2 составило 73% ($p < 0,01$) и 84% ($p < 0,01$) соответственно. В контрольной группе

показатель пересечения внешних квадратов на протяжении 10 дней эксперимента находился в диапазоне средней величины: от 22,70±4,98 до 24,40±3,19.

Достоверные изменения спонтанной исследовательской активности (норкового рефлекса) наблюдались в группе-1 на 10-й день, уменьшение составило 43% ($p < 0,05$). В группе-2 снижение к 10-му дню составило 15% ($p < 0,05$). После 3-го дня в группе-1 выявлено увеличение числа исследуемых норок на 16%, а в группе -2 – снижение на 5%.

Число вертикальных стоек на всех этапах тестирования в опытных группах снижалось. На 3-й день снижение составило на 73% и 82% в группах -1 и -2 соответственно. На 10-й день снижение уже составило 87% ($p < 0,01$) и 78% ($p < 0,01$) в соответствующих группах. В контрольной группе наблюдалось увеличение вертикальной активности. На 3-й и 10-й дни показатель увеличился на 49% и 78% соответственно.

Показатели ориентировочно-исследовательской активности в группах в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта» представлены в таблице 8.

Таблица 8

Показатели исследовательской активности
в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатели ($M \pm m$)	Контрольная группа		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в открытых рукавах	2,73±0,61	3,40±0,99	3,47±0,99
Общее время двигательной активности	3,77±0,72	2,75±0,49	2,37±0,35
Количество свешиваний	7,80±1,76	8,00±1,94	8,40±1,35
Количество вертикальных стоек	5,50±0,88	4,50±1,14	8,70±2,08

Продолжение таблицы 8

Показатели ($M \pm m$)	Группа -1 с использованием МУНТ-1		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в открытых рукавах	2,42±0,51	4,43±1,38	1,77±0,84
Общее время двигательной активности	3,25±0,46	2,11±0,55	1,13±0,36*
Количество свешиваний	8,80±1,60	8,50±2,49	3,70±1,41*
Количество вертикальных стоек	7,10±1,78	5,70±1,96	3,60±1,60*

Окончание таблицы 8

Показатели ($M \pm m$)	Группа -2 с использованием МУНТ-2		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в открытых рукавах	3,59±1,05	4,57±1,65	1,56±0,60
Общее время двигательной активности	3,41±0,58	2,20±0,53	1,01±0,29**
Количество свешиваний	10,10±2,43	6,00±2,21	3,20±0,93**
Количество вертикальных стоек	5,50±1,79	2,20±0,83	2,90±0,97*
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

К 10-му дню отмечается снижение показателей исследовательской активности в «приподнятом крестообразном лабиринте». Время пребывания в открытых рукавах в опытных группах на 3-й день возрастало. Увеличение составило в группах -1 и -2 на 83% и 27% соответственно. А на 10-й день достоверной разницы не выявлено, но тенденция снижения данного показателя

составила 27% и 57% в соответствующих группах. В контрольной группе показатель увеличивался на протяжении всего эксперимента. Увеличение составило 24% и 27% на 3-й и 10-й дни соответственно.

Время двигательной активности в лабиринте имело тенденцию к снижению во всех группах. В контрольной группе снижение, по сравнению с контрольным значением, на 3-й и 10-й день составило 27% и 37% соответственно. В опытных группах обнаруживалась статистически достоверная разница в изменении данного показателя. Снижение на 3-й день составило в группах -1 и -2 35% и 36% соответственно. На 10-й день разница составила, по сравнению с контрольным исследованием, 65% ($p < 0,05$) и 70% ($p < 0,01$) в соответствующих группах.

Количество свешиваний увеличивалось в контрольной группе и уменьшалось в опытных. В группах -1 и -2 на 3-й день снижение составило 4% и 41% соответственно, а на 10-й день оно имело достоверные результаты и составило 58% ($p < 0,05$) и 68% ($p < 0,01$) в соответствующих группах. В контрольной группе произошло увеличение показателя на 2% и 8% на 3-й и 10-й день.

Количество вертикальных стоек также имели тенденцию к снижению в экспериментальных группах. На 3-й день в опытных группах -1 и -2 снижение составило 20% и 60% соответственно. На 10-й день разница составила 49% ($p < 0,05$) и 47% ($p < 0,05$) в соответствующих группах.

Все интегральные поведенческие показатели представлены, как статистически рассчитанные средние велечины по эксперемнтальным группам животных.

Динамика изменения интегрального показателя исследовательской активности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в таблице 9.

Интегральный показатель ИА в «открытом поле» в контрольной группе увеличивался от среднего значения 56,81±9,41 – при контрольном исследовании до 76,30±15,98 – при тестировании после 10-го дня опыта. Увеличение на 3-й день составило 16%, на 10-й – 34%. В группах -1 и -2 зафиксировано снижение на 3-й и

10-й день эксперимента. На 3-й день уменьшение показателя составило 40% и 70% (p<0,05) соответственно, на 10-й день произошло уменьшение интегрального показателя на 74% ($p < 0,001$) и 77% ($p < 0,05$) в соответствующих опытных группах.

Таблица 9

Изменения интегрального показателя ориентировочно-исследовательской активности

Типы вводимых МУНТ	«Открытое поле»		
	Контроль	После 3-го дня	После 10-го дня
Контроль	56,81±9,41	66,02±15,82	76,30±15,98
МУНТ-1	60,07±11,55	36,18±10,68	15,95±4,73**
МУНТ-2	84,21±18,80	25,24±7,73*	19,60±8,31*

Окончание таблицы 9

Типы вводимых МУНТ	«Приподнятый крестообразный лабиринт»		
	Контроль	После 3-го дня	После 10-го дня
Контроль	19,80±3,50	18,65±4,33	22,94±4,25
МУНТ-1	20,57±3,77	20,47±5,82	10,20±4,01*
МУНТ-2	22,60±5,55	14,97±4,22	8,67±2,52*
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

В крестообразном лабиринте общий показатель в контрольной группе увеличился к 10-му дню на 15%. В группе -1 показатель снижался к 10-му дню на 51% ($p < 0,05$), а в группе -2 зарегистрировано снижение ИА и на 3-й день – на 34%, и на 10-й день – на 62% ($p < 0,05$).

Показатели уровня тревожности в разных группах в «открытом поле» показаны в таблице 10.

Наиболее выраженные изменения произошли в показателях времени замирания. В группе -1 на 3-й и 10-й день время фризинга увеличилось на 133% и 196% ($p < 0,01$) соответственно. В группе -2 увеличение составляло 83% и 101% в эти же дни. В контрольной группе время замирания увеличилось на 3-й день на 118% и к 10-му дню на 93%, по сравнению с контрольными значениями. Показатель уменьшился на 12% к 10-му дню относительно 3-го дня эксперимента.

Число грумингов уменьшалось в контрольной группе на 17% и 25% на 3-й и 10-й день соответственно. Животные группы-1 показали уменьшение показателя на 33% и 58% в экспериментальные дни. В группе -2 показатель на 3-й день вырос на 44% и уменьшился на 10-й день, по сравнению с 3-м днем, на 31%, достигнув среднего значения контрольного исследования.

Число болюсов и уринаций оставалось примерно на одном уровне, и статистически значимых различий не выявлено.

Таблица 10

Динамика изменения тревожности крыс в тестах «открытое поле»

Показатели ($M \pm m$)	Контрольная группа		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Общее время замирания	2,21±0,94	4,82±1,42	4,27±1,32
Общее число грумингов	1,20±0,60	1,00±0,35	0,90±0,46
Сумма болюсов	0,00±0,00	0,10±0,10	0,10±0,10

Продолжение таблицы 10

Показатели ($M \pm m$)	Группа -1 с использованием МУНТ-1		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Общее время замирания	3,17±0,67	7,39±1,64	9,37±0,85**
Общее число грумингов	1,20±0,43	0,80±0,38	0,50±0,32
Сумма болюсов	0,10±0,10	0,00±0,00	0,50±0,32

Окончание таблицы 10

Показатели ($M \pm m$)	Группа -2 с использованием МУНТ-2		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Общее время замирания	3,73±1,62	6,84±1,55	7,51±1,67
Общее число грумингов	0,90±0,33	1,30±0,54	0,90±0,67
Сумма болюсов	0,00±0,00	0,30±0,22	0,50±0,36
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

Данные изменения тревожности в «приподнятом крестообразном лабиринте» представлены в таблице 11.

Таблица 11

Значения показателей тревожности в «приподнятом крестообразном лабиринте»

Показатели ($M \pm m$)	Контрольная группа		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в закрытых рукавах	61,08±2,45	58,40±3,95	58,12±3,97
Общее число грумингов	0,50±0,36	0,80±0,34	0,90±0,37
Сумма болюсов	0,00±0,00	0,10±0,10	0,00±0,00

Продолжение таблицы 11

Показатели ($M \pm m$)	Группа -1 с использованием МУНТ-1		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в закрытых рукавах	62,32±2,02	54,28±5,51	64,84±3,42
Общее число грумингов	1,30±0,52	0,60±0,23	1,00±0,57
Сумма болюсов	0,30±0,22	0,30±0,22	0,20±0,21

Окончание таблицы 11

Показатели ($M \pm m$)	Группа -2 с использованием МУНТ-2		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в закрытых рукавах	57,64±4,20	53,72±6,60	58,56± 7,23
Общее число грумингов	1,10±0,66	0,80±0,47	0,60±0,28
Сумма болюсов	0,10±0,10	0,00±0,00	0,20±0,21
Примечание – «*» – при $p < 0,05$, «**» – при $p < 0,01$.			

Время пребывания в закрытых рукавах лабиринта в контрольной группе уменьшалось на 4% и 5% на 3-й и 10-й день эксперимента. В экспериментальных группах показатель варьировался. В группе -1 на 3-й день снижался на 13%, а в группе -2 – на 7%. Но к 10-му дню показатель увеличился незначительно в сравнении с контрольными значениями. В группах -1 и -2 на 4% и 1% соответственно.

Число грумингов в контрольной группе увеличилось в 1,6 раза на 3-й день – и к 10-му дню увеличение составило 1,8 раза. В группе -1 показатель изменялся в сторону уменьшения на 3-й день на 54%, а после 10-го дня увеличился, по сравнению показателем 3-го дня, на 67%. В группе -2 количество грумингов уменьшалось на 27% и 46% после 3-го и 10-го дня эксперимента соответственно. Число болюсов не варьировалось в широких пределах. В группе «Контроль» колебания составляли от 0,00±0,00 до 0,10±0,10. В группе -1 к 10-му дню показатель уменьшался на 33% только, а в группе -2 к 10-му дню увеличивался в 2 раза.

Интегральные показатели тревожности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в таблице 12.

Интегральный показатель тревожности в «открытом поле» в контрольной группе увеличился на 74% и 54% на 3-й и 10-й день соответственно. Снижение показателя по отношению к 3-му дню составило 11%. В опытных группах

прослеживалась динамика на увеличение тревожности с достоверными результатами после 10-го дня употребления нанотрубок. На 3-й день увеличение в группах -1 и -2 составило 123% и 82% соответственно. После 10-го дня увеличение в тех же группах составляло 182% ($p < 0,01$) и 92% ($p < 0,05$).

В «приподнятом крестообразном лабиринте» на 10-й день увеличение тревожности наблюдалось незначительное. В группе -1 увеличение составляло 3%, а в группе -2 – всего 1%. На 3-й день показатель снижался в данных группах на 14% и 8% соответственно. Но, по критерию Манна – Уитни, в сравнении с контрольной группой, на 10-й день зафиксированы статистически достоверные результаты ($p < 0,05$) в экспериментальных группах. В контрольной группе показатель тревожности снижался на 3-й и 10-й день на 4% и 9% соответственно.

Таблица 12

Интегральные показатели тревожности

Типы вводимых МУНТ	«Открытое поле»		
	Контроль	После 3 дней	После 10 дней
Контроль	3,41±1,25	5,92±1,26	5,27±1,24
МУНТ-1	3,67±0,83	8,19±1,66	10,37± 0,82**
МУНТ-2	4,63±1,76	8,44±1,62	8,91±1,69*

Окончание таблицы 12

Типы вводимых МУНТ	«Приподнятый крестообразный лабиринт»		
	Контроль	После 3 дней	После 10 дней
Контроль	61,58±2,37	59,30±3,90	55,92±2,89
МУНТ-1	63,92±2,12	55,18±5,43	66,04±3,60*
МУНТ-2	58,94±3,99	54,32±6,71	59,36±2,36*
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

Полученные показатели поисковой активности представлены в таблице 13.

Таблица 13

Показатели поисковой активности в универсальной проблемной камере

Показатели	Контрольная группа		
	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные побежки	2,70±0,50	3,00±0,67	2,00±0,47
Неправильные побежки	5,20±1,97	3,90±1,22	2,30±0,42
Время поиска	17,50±3,84	13,20±1,70	13,10±2,07
Интенсивность поиска	4,70±1,37	5,10±1,84	4,70±0,94

Продолжение таблицы 13

Показатели	Группа -1 с использованием МУНТ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные побежки	2,50±0,61	1,50±0,65	0,00±0,00***
Неправильные побежки	3,80±2,09	4,00±2,44	0,00±0,00***
Время поиска	14,40±3,45	7,20±1,46**	5,20±1,89**
Интенсивность поиска	5,00±1,28	5,10±1,84	1,30±0,75**

Окончание таблицы 13

Показатели	Группа -2 с использованием МУНТ-2		
	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные побежки	2,10±0,73	1,10±0,62*	0,00±0,00***
Неправильные побежки	2,40±0,85	3,70±2,99	0,00±0,00***
Время поиска	10,70±1,21	9,50±1,72	4,50±0,91**
Интенсивность поиска	3,60±1,03	3,10±1,82	0,50± 0,36**
Примечание – «*» – при $p < 0,05$, «**» – при $p < 0,01$.			

В таблице 14 можно пронаблюдать данные об изменении когнитивного показателя.

Таблица 14

Изменение когнитивного показателя лабораторных крыс

Группа	Группа -1 с использованием МУНТ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Когнитивный показатель ($M \pm m$)	44,92±10,96	22,71±7,38	0,00±0,00
U-критерий	P = 0,88	P = 0,096	P = 0,001***

Продолжение таблицы 14

Группа	Группа – 2 с использованием МУНТ-2		
	1-й день	3-й день	10-й день
Когнитивный показатель ($M \pm m$)	42,55±6,58	18,71±8,05	0,00± 0,00
U-критерий	P = 0,88	P = 0,06	P = 0,001***

Окончание таблицы 14

Группа	Контроль		
	1-й день	3-й день	10-й день
Когнитивный показатель ($M \pm m$)	42,89±5,01	44,68±11,09	41,03±7,10
U-критерий			
Примечание – «*» – при $p < 0,05$, «**» – при $p < 0,01$, «***» – при $p < 0,001$.			

Энергетические показатели поисковой активности внутри каждой опытной группы снижались. Время поиска уменьшалось на 50% ($p < 0,01$) в группе -1 и на 11,2% в группе -2. На 10-й день разница в процентном соотношении, по сравнению с контрольными значениями, составила 64% ($p < 0,01$) и 58% ($p < 0,01$) в соответствующих группах. В контрольной группе время поиска снизилось к 3-му дню на 25%, а к 10-му дню оставалось на этом же уровне.

Изменения интенсивности поиска выявлены только на 10-й день в экспериментальных группах. Уменьшение составило 74% ($p < 0,01$) и 86% ($p < 0,01$) в группах -1 и -2 соответственно.

Когнитивный показатель оценивался числом правильных и неправильных побежек. Количество правильных побежек уменьшалось к 3-му дню на 40% и 48% в группах -1 и -2 соответственно. На 10-й день регистрировался отказ от поиска.

Неправильные побежки уменьшались в контрольной группе на 25% в 3-й день и на 56% в 10-й день эксперимента. В опытных группах, наоборот, число ошибок возрастало к 3-му дню на 5% – в группе -1 и на 54% – в группе -2. На 10-й день побежек не зарегистрировано.

Когнитивный показатель в контрольной группе оставался в пределах (41,03±7,10) – (44,68±11,09). В опытных группах он имел тенденцию к снижению на 3-й день – на 50% и 56% в группах -1 и -2 соответственно. На 10-й день определить когнитивный показатель не удалось в силу отказа от поиска.

3.5.2 Исследование влияния углеродных нановолокон.

Полученные результаты исследования действия углеродных нановолокон типов УНВ-1 и УНВ-2 на поведенческие показатели в тесте «открытое поле» представлены в таблице 15.

При анализе полученных данных в тесте «открытое поле» зарегистрировано уменьшение показателей ИА и незначительное увеличение тревожности у крыс.

Выраженных изменений в показателях латентного времени не выявлено. Двигательная активность в контрольной группе снижалась с 1-го дня к 10-му на 35%. В опытных группах показатель также уменьшался: разница на 3-й день составила 38% и 37% в группе -1, употреблявших с пищей УНВ-1 и в группе -2, употреблявших УНВ-2 соответственно. А к 10-му дню разница имела значения 70% ($p < 0,01$) и 60% ($p < 0,01$) в соответствующих группах.

Таблица 15

Показатели ориентировочно-исследовательской активности в группах

Показатели	Контрольная группа		
	1-й день	3-й день	10-й день
Латентное время	0,00±0,00	-0,25±0,26	0,00±0,00
Общее время двигательной активности	4,48±0,41	3,39±0,40	2,92±0,27
Пересечение внутренних квадратов поля	7,00±1,70	13,80±3,87	7,00±2,31
Пересечения внешних квадратов	44,50±5,38	38,40±3,50	30,80±2,74
Число заглядываний в норки	5,30±0,74	6,20±1,53	2,60±0,45
Количество вертикальных стоек	17,80±3,70	10,60±2,69	14,60±3,62

Продолжение таблицы 15

Показатели	Группа -1 с использованием УНВ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Латентное время	-0,10±0,07	0,00±0,00	-0,05±0,05
Общее время двигательной активности	4,89±0,42	3,06±0,40	1,45±0,33**
Пересечение внутренних квадратов поля	12,60±3,03	14,20±3,41	12,80±3,63
Пересечения внешних квадратов	40,10±3,59	39,20±6,50	23,50±4,69
Число заглядываний в норки	7,30±1,19	5,80±0,49	2,80±0,41
Количество вертикальных стоек	20,20±2,44	14,00±4,94	13,40±4,02

Окончание таблицы 15

Показатели	Группа – 2 с использованием УНВ-2		
	1 день	3 день	10 день
Латентное время	0,00±0,00	00,00±0,00	-0,10±0,10
Общее время двигательной активности	5,01±0,26	3,14±0,31	2,02±0,19**

Пересечение внутренних квадратов поля	13,00±2,46	16,80±2,69	11,60±2,10
Пересечения внешних квадратов	38,00±3,36	37,90±3,80	29,70±2,91
Число заглядываний в норки	5,70±0,72	5,70±1,10	3,70±0,54
Количество вертикальных стоек	17,40±2,49	17,20±3,05	16,20±2,44
Примечание – «*» – при $p < 0,05$, «**» – при $p < 0,01$.			

Пересечения внутренних квадратов поля в контрольной группе увеличивались к 3-му дню на 97%, но к 10-му дню средняя арифметическая достигла своего контрольного значения. Примерная картина наблюдалась и в опытных группах: увеличение к 3-му дню в группах -1 и -2 составило 12% и 29% соответственно. На 10-й день значения стремились к контрольным в группе -1. А в опытной группе -2 с примененнием типа нановолокон УНВ-2 значение упало на 11%, по сравнению с первым днем тестирования. Достоверной разницы не обнаружено.

Пересечения внешних квадратов во всех группах уменьшались. В контрольной группе снижение на 3-й день составило 14% и к 10-му дню – 31%. В опытных группах -1 и -2 снижение составило 2% и 1% к 3-му дню соответственно, а на 10-й день разница составила, по сравнению с контрольными значениями, 41% и 22% соответственно. Достоверных статистических значений не обнаружено.

Число заглядываний в норки в контрольной группе варьировалось в диапазоне (2,60±0,45) – (6,20±1,53). Уменьшение к 10-му дню в данной группе составило 51%. На 3-й день показатель изменялся в большую сторону, и разница увеличения в процентном выражении составила 17%. В группе -1 показатель имел четкую тенденцию к снижению, но при этом достоверной разницы не обнаружено. Снижение в данной группе на 3-й и 10-й день эксперимента составило 21% и 62% соответственно. В группе -2 средняя арифметическая оставалась прежней на 3-й день. Для сравнения, количественное выражение в контрольном исследовании показателя составляло 5,70±0,72, на 3-й день –

5,70±1,10. На 10-й день количество заглядываний в норки уменьшалось на 35%. Достоверных различий по критерию *U* не выявлено.

Изменения в вертикальной активности не имели статистических различий по критерию Манна – Уитни, но тенденция уменьшения наблюдалась внутри групп. В контрольной группе показатель варьировался, и четкого снижения не отмечалось. Количество вертикальных стоек в данной группе на 3-й день уменьшилось на 41%, а к 10-му дню, по сравнению с контрольным, снизился на 18%, то есть увеличился по отношению к 3-му дню на 38%. В группе -1 обнаружена склонность к снижению на всех этапах тестирования, по сравнению с контрольными значениями. Снижение составило на 3-й и 10-й день 31% и 34% соответственно. В группе -2, аналогично, показатель норкового рефлекса на 3-й день оставался в диапазоне контрольного значения (17,20±3,05), а на 10-й день снизился на 7%.

Данные исследовательской активности в «приподнятом крестообразном лабиринте» представлены в таблице 16.

При анализе ИА в ПКЛ зарегистрированы следующие изменения показателей активности. Время пребывания в открытых рукавах лабиринта варьировалось в контрольной группе в сторону увеличения и уменьшения.

Таблица 16

Данные исследовательской активности в ПКЛ

Показатели	Контрольная группа		
	1-й день	3-й день	10-й день
Время пребывания в открытых рукавах	3,29±0,99	6,88±1,74	5,21±1,89
Общее время двигательной активности	3,54±0,31	2,33±0,20	2,01±0,26
Число вертикальных стоек	4,90±1,84	3,50±1,07	4,00±1,30
Количество свешиваний	10,10±1,38	11,10±1,89	7,80±1,12

Продолжение таблицы 16

Показатели	Группа – 1 с использованием УНВ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Время пребывания в открытых рукавах	5,92±1,06	5,83±1,52	6,82±1,86
Общее время двигательной активности	3,09±0,16	1,65±0,18*	1,46±0,21
Число вертикальных стоек	3,30±0,83	5,70±1,62	4,90±1,28
Количество свешиваний	10,30±1,71	6,90±1,61	5,00±0,86

Окончание таблицы 16

Показатели	Группа -2 с использованием УНВ-2		
	1-й день	3-й день	10-й день
Время пребывания в открытых рукавах	6,02±1,36	4,64±1,26	2,01±0,86
Общее время двигательной активности	3,76±0,35	1,72±0,19 *	1,33±0,23 *
Число вертикальных стоек	4,60±1,18	4,20±1,21	4,30±1,18
Количество свешиваний	14,80±2,58	5,90±0,81 *	2,30±0,54 ***
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$; «***» – при $p < 0,001$.			

Так, на 3-й день значение времени увеличилось в 2 раза, а на 10-й день – в 1,6 раза по отношению к контрольному значению. Если сравнивать изменения во времени пребывания в открытых рукавах между 3-й и 10-м днями, то показатель на 10-й день снизился на 24%. В группе -1 показатель увеличился к 10-му дню на 15%, на 3-й день оставался практически на одном уровне с контрольным. В опытной группе -2, наоборот, прослеживалась четкая отрицательная динамика. Так, на 3-й день среднее значение снижалось на 23%, а к 10-му дню разница уже составила 67%.

Общее время двигательной активности снижалось во всех группах. Так, в контрольной группе разница на 3-й и 10-й день, по отношению к контрольному значению, составила 34% и 43% соответственно. В группе -1 аналогичная разница выражалась в значениях 47% ($p < 0,05$) и 53% соответственно. В группе -2 на 3-й и 10-й день, по сравнению с контрольным исследованием, разница в процентном выражении составила 54% ($p < 0,05$) и 65% ($p < 0,05$).

Вертикальная активность варьировалась в контрольной группе. Уменьшение составляло к 3-му дню 29% и на 10-й день – 18%. Если рассматривать разницу между значениями 3-го и 10-го дней, то по отношению к 3-му дню показатель увеличился на 14%. В экспериментальной группе -1, показатель также варьировался, и четкой стратегии к снижению либо увеличению не выявлено. Так, показатель вертикальных стоек в данной группе увеличивался на 3-й день на 73%, а на 10-й – на 48%, но по отношению к 3-му дню на 10-й день число стоек снизилось на 14%. В группе -2 средняя величина количества вертикальных стоек варьировалась незначительно. Разница снижения на 3-й и 10-й день, в сравнении с контрольными значениями, составила 9% и 7% соответственно.

Число свешиваний в рукавах лабиринта варьировалось в контрольной группе незначительно. На 3-й день количество свешиваний увеличилось на 10% и на 10-й день уменьшилось на 23%. В опытных группах показатель имел выраженный характер снижения. Разница между уменьшениями значений на 3-й день эксперимента в группах -1 и -2 составила 33% и 60% ($p < 0,05$) соответственно. На 10-й день показатель уменьшался на 52% и 85% ($p < 0,001$) в соответствующих группах.

Динамика изменения интегрального показателя исследовательской активности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» представлены в таблице 17.

Интегральный показатель исследовательской активности в «открытом поле» имел склонность к снижению. При этом статистически достоверных различий по *U*-критерию не определено. В контрольной группе показатель снижался на 3-й и

10-й день на 9% и 27% соответственно. В группе -1 на 10% и 37% в эти же дни. В группе -2 на 20% после 10 дней употребления нановолокон. На 3-й день показатель увеличился незначительно – на 2%.

Таблица 17

Интегральные показатели ориентировочно-исследовательской активности в «открытом поле» и «приподнятом крестообразном лабиринте»

Типы вводимых УНВ	«Открытое поле»		
	Контроль	После 3 дней	После 10 дней
Контроль	79,08±8,23	72,14±8,00	57,92±6,06
УНВ-1	84,99±7,07	76,46±12,98	53,90±10,41
УНВ-2	79,11±4,29	80,74±5,14	63,12±4,87

Окончание таблицы 17

Типы вводимых УНВ	«Приподнятый крестообразный лабиринт»		
	Контроль	После 3 дней	После 10 дней
Контроль	21,83±3,42	23,41±3,72	19,20±2,39
УНВ-1	22,61±3,06	20,08±4,47	18,18±2,99
УНВ-2	29,18±4,50	16,46±2,58	9,94±2,09**
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

Интегральный показатель исследовательской активности в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта» имел иную зависимость, чем в «открытом поле». Контрольная группа имела показатели в пределах диапазона (19,20±2,39) – (23,41±3,72). Но на 10-й день снижение активности наблюдалось, и разница с контрольными значениями составила 12%.

В экспериментальных группах показатель ИА стремился к снижению. На 3-й день уменьшение в группах -1 и -2 составило 11% и 44% соответственно. На 10-й день показатель снижался в этих же группах на 20% и 66% ($p < 0,01$) соответственно.

Статистические показатели уровня тревожности в группах в тесте «открытого поля» указываются в таблице 18.

Статистически достоверные данные зафиксированы в группе -1 для значений времени замирания на 10-й день: в данной группе этот показатель на 10-й день увеличился в 20 раз ($p < 0,05$); в группе -2 на этот день – в 18 раз.

Таблица 18

Данные тревожности в тесте «открытое поле»

Показатели ($M \pm m$)	Контрольная группа		
	1-й день	3-й день	10-й день
Общее время замирания	0,23±0,19	1,09±0,60	0,72±0,30
Общее число грумингов	1,90±0,48	2,10±0,37	1,80±0,31
Сумма болюсов	0,10±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00

Продолжение таблицы 18

Показатели ($M \pm m$)	Группа -1 с использованием УНВ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Общее время замирания	0,11±0,05	0,92±0,26	2,18±0,79*
Общее число грумингов	2,20±,52	1,90±0,33	0,80±0,38
Сумма болюсов	0,10±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00

Окончание таблицы 18

Показатели ($M \pm m$)	Группа -2 с использованием УНВ-2		
	1-й день	3-й день	10-й день
Общее время замирания	0,07±0,04	0,84±0,48	1,30±0,47
Общее число грумингов	2,70±0,50	1,40±0,45	2,30±0,63
Сумма болюсов	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

Число грумингов увеличивалось на 10% на 3-й день в контрольной группе, а на 10-й день по отношению к 3-му дню снизился на 14%. В группе -1, показатель снижался на 3-й и 10-й день на 14% и 64% соответственно. В группе -2 показатель колебался на 3-й день в сторону уменьшения на 48% и на 10-й день – увеличения, по сравнению с показателями 3-го дня, на 15%. Элиминационная активность

изменялась в диапазоне (0,00±0,00) – (0,10±0,10) в контрольной группе и группе -1. В опытной группе -2 не зафиксированы уринации и болюсы.

Оценка показателей тревожности в ПКЛ представлена в таблице 19.

Время пребывания в закрытых рукавах лабиринта уменьшалось в контрольной группе на 27% и 13% на 3-й и 10-й день соответственно. В группе -1 значение времени оставалось на уровне контрольного на 3-й день и снижалось на 10-й день на 8%. Группа -2 изменяла свои показатели в сторону увеличения. Время пребывания в закрытых рукавах лабиринта увеличивалось на 3-й и 10-й день на 11% и 33% соответственно. Статистически достоверных различий по критерию Манна – Уитни не зафиксировано.

Таблица 19

Показатели тревожности в ПКЛ

Показатели ($M \pm m$)	Контрольная группа		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в закрытых рукавах	58,84±3,98	42,76±6,41	51,16±7,55
Общее число грумингов	0,10±0,10	0,60± 0,36	0,80±0,54
Сумма болюсов	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Продолжение таблицы 19

Показатели ($M \pm m$)	Группа -1 с использованием УНВ-1		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня
Время пребывания в закрытых рукавах	48,3±4,26	48,68±6,06	44,72±7,44
Общее число грумингов	0,50±0,23	1,30±0,45	0,30±0,16
Сумма болюсов	0,10±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00

Окончание таблицы 19

Показатели ($M \pm m$)	Группа -2 с использованием УНВ-2		
	1-й день	После 3-го дня	После 10-го дня

Время пребывания в закрытых рукавах	47,91±5,43	53,4±5,04	63,96±3,45
Общее число грумингов	0,40±0,17	0,60±0,42	0,40±0,23
Сумма болюсов	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

Число грумингов в контрольной группе возросло на 10-й день в 8 раз. В группе -2 показатель груминга колебался в пределах контрольных значений, а в группе -1, увеличивался на 3-й день в 2,6 раза, а к 10-му дню снижался, по отношению к контрольному значению, на 40%. Число болюсов и уринаций колебалось в пределах от (0,00±0,00) до (0,10±0,10) в группе -1. В остальных группах элиминационной активности не отмечалось.

Интегральные значения показателей тревожности приводятся в таблице 20.

Таблица 20

Интегральные значения уровня тревожности

Типы вводимых УНВ	«Открытое поле»		
	Контроль	После 3 дней	После 10 дней
Контроль	2,23±0,49	3,19±0,58	2,43±0,34
УНВ 1	2,31±0,50	2,82±0,31	3,79± 0,74
УНВ 2	2,77±0,50	2,24±0,56	3,60±0,92

Окончание таблицы 20

Типы вводимых УНВ	«Приподнятый крестообразный лабиринт»		
	Контроль	После 3 дней	После 10 дней
Контроль	58,94±3,98	45,08±6,92	51,96±7,68
УНВ 1	48,92±4,23	49,98±6,17	45,02±7,48
УНВ 2	48,32±5,50	54,04±5,20	64,36±3,36
Примечание – «*» – при $p < 0,05$, «**» – при $p < 0,01$.			

Интегральный показатель тревожности в «открытом поле» изменялся незначительно в опытных группах. В группе -1 на 3-й день произошло увеличение показателя на 22% и на 10-й день – на 64%. В группе -2 увеличение регистрировалось только на 10-й день – повышение составило 30%. На 3-й день в этой же группе тревожность изменялась в сторону уменьшения на 19%. Статистических различий не выявлено.

В крестообразном лабиринте тревожность уменьшалась в контрольной группе на 24% и 12% на 3-й и 10-й день эксперимента соответственно. Снижение тревожности после 10 дней произошло и в группе -1 на 8% и увеличение – на 3-й день на 2%. В группе -2 четко прослеживается увеличение тревожности. Разница с контрольным тестированием составила на 3-й и 10-й день 12% и 33% соответственно. Статистической разницы не обнаружено.

В таблице 21 указываются количественные показатели поисковой активности в УПК, а в таблице 22 – количественное выражение когнитивного показателя.

Число правильных побежек в контрольной группе не отличалось на 1-й и 10-й день эксперимента. К 3-му дню показатель снижался на 10%.

Таблица 21

Значения поисковой активности в УПК

Показатели	Контрольная группа		
	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные побежки	6,00±0,00	5,40,±0,36	6,00±0,00
Неправильные побежки	7,60±3,21	4,80±1,03	7,50±2,62
Время поиска	11,10±1,74	9,80±0,87	6,40±1,01
Интенсивность поиска	15,30±5,22	16,60±3,17	14,00±2,61

Продолжение таблицы 21

Показатели	Группа -1 с использованием УНВ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные побежки	5,40±0,63	5,40±0,45	4,30±0,82
Неправильные побежки	6,80±2,83	5,10±1,22	6,90±2,22
Время поиска	11,60±1,42	11,10±0,95	7,90±1,63
Интенсивность поиска	13,00±3,06	9,60±1,45	11,70±3,13

Окончание таблицы 21

Показатели	Группа – 2 с использованием УНВ-2		
	1-й день	3-й день	10-й день
Правильные побежки	5,90±0,10	5,50±0,42	6,00±0,00
Неправильные побежки	9,70±3,07	4,20±1,40	10,10±4,50
Время поиска	10,40±1,04	9,80±1,07	9,00±1,59
Интенсивность поиска	14,20±2,85	9,80±1,80	17,20±4,63
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$.			

В группе -1 результативные побежки уменьшались только к 10-му дню, на 20% ($p < 0,05$), а в группе -2 показатель варьировался, и четкой зависимости к уменьшению или увеличению не проявлялось. Так, к 3-му дню в данной группе показатель уменьшился на 7%, а к 10-му – увеличился, по сравнению с контрольным, всего на 2%.

Таблица 22

Количественное выражение когнитивного показателя

	Контроль		
	1-й день	3-й день	10-й день
Когнитивный показатель ($M \pm m$)	57,20±7,86	44,30±9,02	58,90±10,00
U-критерий			

Продолжение таблицы 22

	Группа – 1 с использовнаием УНВ-1		
	1-й день	3-й день	10-й день
Когнитивный показатель ($M \pm m$)	54,90±11,99	56,60±5,95	36,10±8,18
U-критерий	$P = 0,68$	$P = 0,16$	$P = 0,14$

Окончание таблицы 22

	Группа -2 с использовнаием УНВ-2		
	1-й день	3-й день	10-й день
Когнитивный показатель ($M \pm m$)	50,60±9,11	56,60±9,37	57,20±10,91
U-критерий	$P = 0,45$	$P = 0,24$	$P = 0,94$
Примечание – «*» – при $p < 0,05$; «**» – при $p < 0,01$; «***» – при $p < 0,001$.			

Количество неправильных побежек в контрольной группе снижалось к 3 дню на 37%, а к 10 дню колебалось в пределах контрольного значения. В группе -1 после 3 дней употребления нановолокон показатель ошибочных побежек уменьшалось на 25%, а к 10 дню увеличился по сравнению с 3 днем на 35%. С контрольным значением разница увеличения на 10 день составляла 1%. Аналогичная картина, но со значительным увеличением на 10 день зарегистрирована и в группе -2. Показатель снизился на 3 день на 57%, а к 10 дню увеличился по отношению к 3 дню на 140%.

Время поиска выхода из проблемной камеры снижалось во всех группах. В контрольной группе снижение после 3-го и 10-го дня эксперимента разница составляла, в соотношении с контрольными значениями, 12% и 42% соответственно. В группе -1 и -2 на 3-й день разница незначительная, уменьшение времени приравнивалось к 4% и 6% соответственно. А после 10 дней разница составляла, по сравнению с контрольными значениями, 32% и 14% в соответствующих группах.

Число целенаправленных побежек, отражающее целенаправленный поиск, варьировалось в контрольной группе. На 3-й день число таких побежек увеличилось на 8% и уменьшилось на 9% на 10-й день, по сравнению с контрольными значениями. В группе -1 и -2 данный показатель после 3-го дня употребления нановолокон уменьшился на 26% и 31% соответственно, а на 10-й день в группе -1 уменьшился на 10%, по отношению к контрольному уровню, а в группе -2 увеличился на 21%.

Достоверных различий по *U*-критерию когнитивных показателей грызунов не выявлено. Но тенденция к снижению определена для группы -1. На 10-й день показатель когнитивных способностей в данной группе снизился на 34%. В контрольной группе значения колебались. На 3-й день уменьшение составляло 23%, а к 10-му дню достиг уровня контрольного и превысил его на 3%, по сравнению с 3-м днем увеличился на 33%. В группе -2 показатель увеличивался на 3-й день на 12% и на 10-й день на 13%, то есть значения когнитивных способностей увеличивались в этой группе к 3-му дню и оставались примерно на одном уровне до конца эксперимента.

Таким образом, наблюдаемые эффекты действия углеродных нанотрубок выражаются в депрессии поведения и снижении когнитивных способностей с одновременным повышением уровня тревожности у лабораторных крыс.

Вариабельность полученных результатов может быть также связана с отличительными условиями тестов при проведении экспериментов. Поэтому для получения объективных результатов нами было использовано несколько оптимизированных тестов. В научной литературе отмечается превалирование теста «приподнятого крестообразного лабиринта» в анализе исследовательской активности (Григорьев и др., 2006). Учитывая, что крысы тестировались в ОП и ПКЛ неоднократно, снижение показателей ИА в контрольной группе согласуется с данными авторов, указывающих об утрате исследовательской активности при исчезновении фактора новизны (Григорьев, 1998; Григорьев и др., 2006).

Различия результатов по определению ориентировочно-исследовательского поведения объясняется отличительными условиями установок «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Отсутствие аналогичной закономерности изменения тревожности в «открытом поле», по сравнению «приподнятым крестообразным лабиринтом», при употреблении МУНТ возможно, связано с наличием в последнем закрытых рукавов, где крыса может спрятаться, что, вероятно, способствует значительно меньшим значениям ее увеличения, по сравнению с «открытым полем». Однако снижения тревожности также не наблюдалось.

В обоих тестах четко прослеживалась тенденция к снижению показателей исследовательской активности в опытных группах. Такое негативное влияние может быть обусловлено увеличением тревожности (Григорьев и др., 2006). Проявлениями отказа от поиска, когда крыса не предпринимает никаких попыток к выходу из стрессорных условий, может быть угнетение ИА в ОП и ПКЛ, что нами и выявлено.

Возможными причинами депрессии врожденной и приобретенной форм поведения могут стать, по нашим представлениям, начальные проявления воспалительного процесса в органах ЖКТ. Учитывая тесную связь головного мозга с кишечником (ось «кишечник – мозг») (Gershon, 1998), влияние морфофункциональных изменений в кишечнике на центральную нервную систему может осуществляться через гуморальный, иммунный (цитокины) и нервный (вегетативная, энтеральная метасимпатическая нервные системы), контуры регуляции (Cryan, Dinan, 2012). По нашему мнению, возможными опосредованными механизмами угнетения ВНД может стать изменения эндокринной функции ЖКТ. По всей видимости, нарушение целостности слизистых оболочек будет способствовать активации ноцицептивных афферентных путей с возникновением висцеральных болей (Carabotti et al., 2015). Возникновение болевых ощущений, с большой долей вероятности, повлечет изменения в регуляторных механизмах энтеральной нервной системы и, соответственно, в синтезе нейропептидов, имеющих отношение к регуляции деятельности головного

мозга. Так как превалирующее большинство серотонинпродуцирующих нейронов локализуется в кишечнике (Gershon, 1998), то, с большей долей вероятности, можно утверждать, что нарушения модуляции серотонинергической системы кишечника будут способствовать депрессии поведения.

Другими возможными причинами угнетения врожденной формы активности могут стать нейрофизиологические аспекты ИА, связанные с активностью адренопозитивных веществ гиппокампальных структур головного мозга и нейротоксическим разрушением катехоламинергических систем и др. (Григорьев и др., 2006). Существуют данные о способности частиц диаметром менее 35 нм преодолевать гемато-энцефалический барьер (Трофимова, 2015), тем самым, возможное окислительное повреждение в гиппокампе крыс может быть одной из причин снижения ИА и когнитивных нарушений, связанных с деструкцией механизмов памяти, как одного из основных компонентов когнитивного поведения.

В научной литературе отмечается, что повреждение и воспаление слизистого слоя кишечника значительно увеличивает сорбцию наночастиц (Подколодная и др., 2012). Также известно, что наночастицы малого диаметра, какими являются углеродные нанотрубки, сорбируются интенсивнее, что обусловлено особенностью муцинового слоя кишечника, которая кроется в биохимической структуре гликопротеина муцина. Размер пор муциновых нитей составляет от 50 до 1800 нм, что является еще одним фактором беспрепятственного преодоления наночастицами размером, меньшим, чем у пор, слизистого барьера (Подколодная и др., 2012).

К.С. Голохваст приводит данные о накоплении нанотрубок в эпителиоцитах желудка и кишечника с формированием иммунного ответа посредством гипертрофии лимфоидной ткани желудочно-кишечного тракта и миграцией иммуноцитов (Голохваст и др., 2013б).

3.6 Исследование биохимических показателей крови при воздействии УНМ

Количественные данные показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантов в крови лабораторных крыс при воздействии МУНТ представлены в таблице 23.

По данным таблицы 23 видно, что значительного увеличения показателей не выявлено, но отмечается рост значений диеновых конъюгатов (см. рисунок 23).

Таблица 23

Показатели ПОЛ сыворотки крови лабораторных белых крыс

Типы вводимых МУНТ	Показатели крови ($M \pm m$)				
	Гидроперикиси липидов, нмоль/мл	Витамин Е, мкг/мл	Церуло-плазмин, мг / 100 мл	Диеновые конъюгаты, нмоль/мл	МДА, нмоль/мл
Контроль	35,990±1,722	46,38±1,66	20,22±0,59	37,65±1,62	4,93±0,31
МУНТ-1	35,690±1,180	48,35±1,70	20,30±0,90	39,06±1,45	5,06±0,12
МУНТ-2	33,210±1,120	47,56±2,18	21,35±0,94	38,85±0,91	5,00±0,25
Примечание – «*» – при $p < 0,05$.					

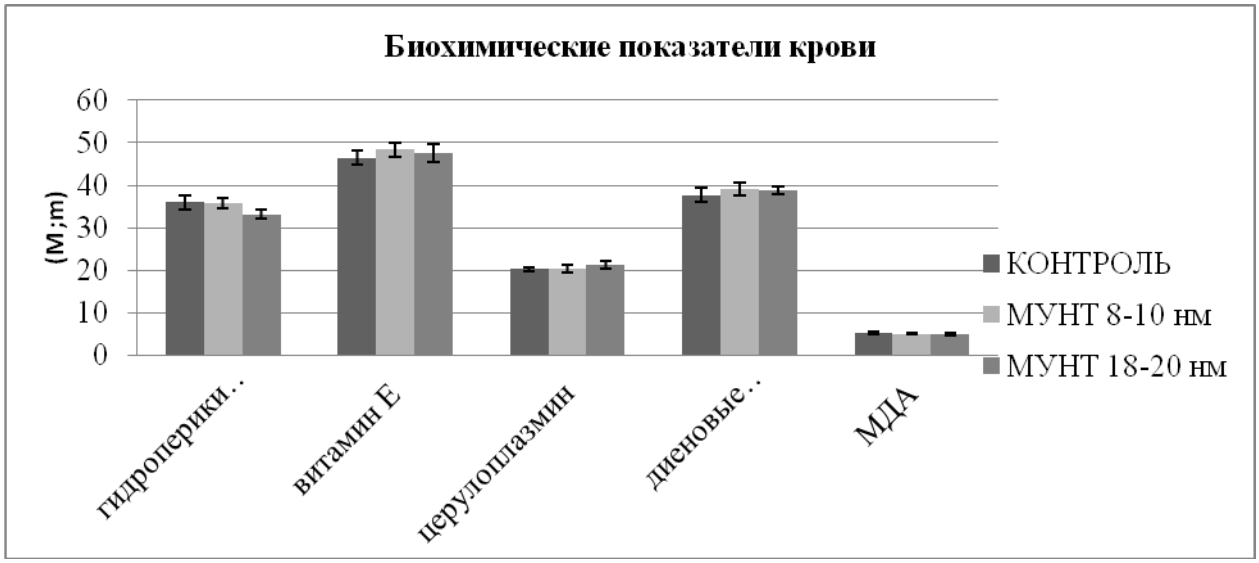


Рисунок 23. Биохимические показатели крови крыс, получавших перорально углеродные нанотрубки

Собственные биохимические результаты крови не показали достоверного увеличения показателей перекисного окисления липидов, церулоплазмина, по сравнению с контрольной группой. Однако наметилась тенденция к увеличению диеновых конъюгатов, что возможно вследствие действия начального этапа усиления свободнорадикальных превращений.

Оценка интерлейкинов в крови лабораторных крыс представлена в таблице 24.

Таблица 24

Интерлейкины крови крыс, употреблявших углеродные нановолокна (пг/мл)

Типы вводимых УНВ	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8
Контроль	0,000±0,000	0,019±0,010	0,000±0,000
УНВ-1	0,000±0,000	0,688±0,190*	0,128±0,140
УНВ-2	0,000±0,000	0,306±0,030*	0,080±0,080

Окончание таблицы 24

Типы вводимых УНВ	ИЛ-1В	ИЛ-10	ИЛ-18
Контроль	3,050±0,760	0,838±0,190	125,570±13,700
УНВ-1	4,600±0,990	2,019±0,360*	202,600±49,520
УНВ-2	4,740±1,410	2,817±0,330*	202,970±83,970
Примечание – «*» – при $p < 0,05$.			

Полученные результаты показывают достоверное увеличение интерлейкинов. Статистически значимые расхождения в концентрациях ИЛ-6 и ИЛ-10 представлены на рисунке 24.

Зафиксировано появление в сыворотке крови опытных групп ИЛ-8, в крови контрольной группы его содержания не выявлено.

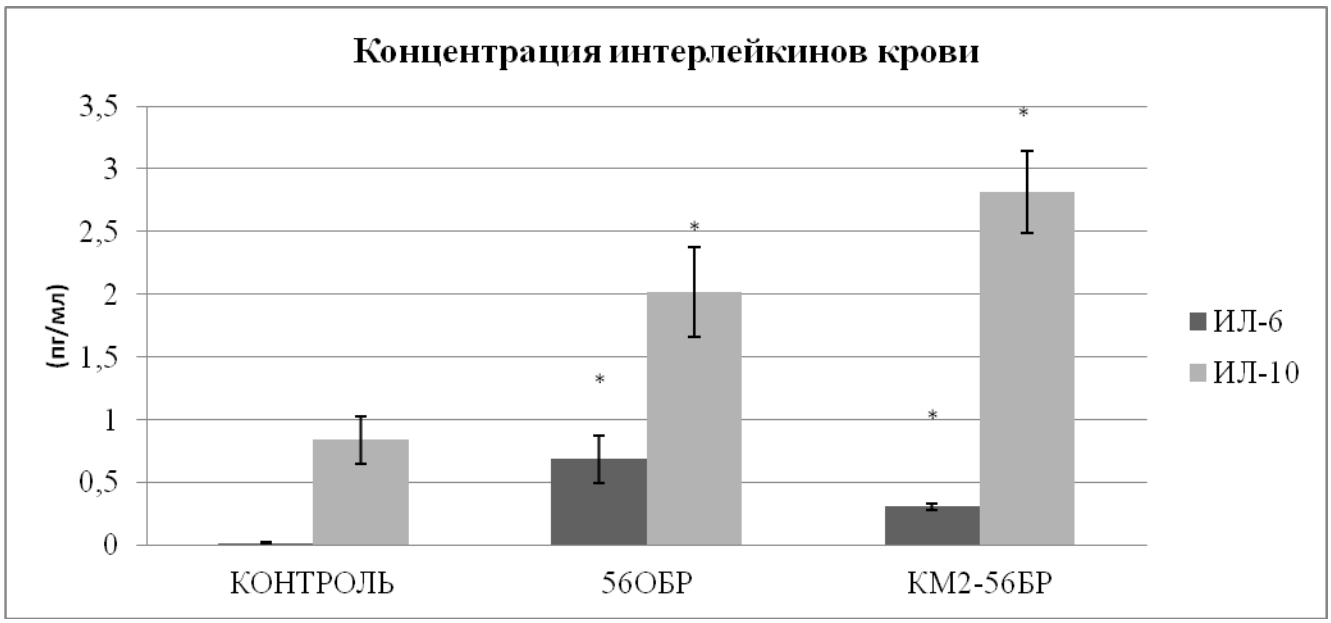


Рисунок 24. Изменение концентрации интерлейкинов в крови крыс при воздействии УНВ

Как известно, развитие воспалительных процессов снижает устойчивость к стрессорным факторам, а, следовательно, адаптивные возможности организма. В научной литературе отмечается, что ориентировочно-исследовательская активность обладает высокой чувствительностью к изменению внешних факторов, и потому неустойчивые крысы отличаются сниженной исследовательской активностью и депрессией поведения (Григорьев и др., 2006).

Поэтому угнетение показателей ИА, по нашим предположениям, может быть обусловлено развитием воспалительных процессов в ЖКТ и сопутствующим снижением стрессоустойчивости животных (Григорьев и др., 2006).

Развитие воспалительных процессов подтверждается ИФА-методом по определению содержания в сыворотке крови интерлейкинов. Показатели интерлейкинов после 10 дней эксперимента оказались выше у лабораторных животных, получавших перрорально углеродные нановолокна. Увеличение продукции интерлейкинов негативно сказывается на функциональном состоянии нервной системы. Нарушаются процессы пластичности нейронов и передачи импульсов в лимбической системе. Происходят изменения в гуморальных механизмах регуляции функций (Gądek-Michalska et. al., 2013).

В научной литературе есть данные о негативном влиянии интерлейкина-1В, интерлейкина-6 для исследовательской активности (Гинзбург и др., 2008; Мамылина, Павлова, 2013), проявляющемся в угасании мотивированного поведения, исследовательской и двигательной активностей, снижении памяти, усилении тревожности, потери аппетита и ангедонии (Мамылина, Павлова, 2013; Maes et. al., 2012). Известно активирующее влияние интерлейкина-1 для гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, структурной единицы нейрогуморальной регуляции стресса (Мамылина, Павлова, 2013).

Интерлейкин-10 и интерлейкин-4 в физиологическом аспекте для поведения являются позитивными (Мамылина, Павлова, 2013), но нами не зарегистрировано появления в крови интерлейкина-4, а позитивное влияние ИЛ-10 может рассматриваться в ингибировании синтеза ИЛ-6.

Увеличение синтеза провоспалительных интерлейкинов через активацию гипоталамо-гипофизарной системы может повлечь выделение кортизола. Предполагается активация выброса кортизола через пептиды энтероэндокринных клеток, в частности галанин (Carabotti et al., 2015).

Деструктивные изменения в ЖКТ предположительно за счет повышенной афферентации позволяют ЦНС влиять на проницаемость слизистой кишечника как проявление компесаторных реакций при проникновении патогенов в эпителий с целью стимуляции иммунного ответа. Влияние на проницаемость может осуществляться через симпатический отдел вегетативной нервной системы. В результате повышения активности тучных клеток в целом и высвобождения биологически активных веществ гистамина в частности облегчается контакт иммунных клеток с инородными антигенами (Carabotti et al., 2015).

Разрозненные изменения когнитивного показателя и компонентов исследовательской активности при употреблении углеродных нановолокон позволяют предположить, что причиной позитивных изменений качественных характеристик поведенческой сферы (увеличение когнитивного показателя) является компенсация снижения количественных характеристик поведенческой

активности в силу соматических причин. Результаты полученных данных дают нам основание предполагать запуск компесаторных механизмов в рамках физиологической нормы. Таким образом, можно считать, что в течение 10 дней выраженные цитотоксические эффекты в структурах головного мозга не успевают сформироваться.

Бесспорно, особая важность технологического процесса производства перспективных наноматериалов обусловливает дальнейшее изучение поставленного вопроса и проведение исследовательской работы.

ВЫВОДЫ

При выполнении диссертационной работы были сформулированы следующие выводы соответстующие задачам научного исследования.

1. Углеродные нанотрубки и углеродные нановолокна из-за неоднородности своей поверхности при попадании в водную среду в течение не менее 24 часов находятся в ней в состоянии взвеси, в дальнейшем агрегируют и стремятся к осаждению.

2. Углеродные нановолокна при пероральном краткосрочном введении крысам, транзиторно проходят через желудочно-кишечный тракт, вызывая морфологические изменения в органах желудочно-кишечного тракта животных.

3. Потребление крысами многослойных углеродных нанотрубок в дозировке 500 мг/кг, в течение 10 дней не влияет на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови.

4. Углеродные нановолокна в течение 10 дней перорального употребления крысами способствуют повышению уровня интерлейкинов -6 и -10 в крови у крыс.

5. Углеродные наноматериалы снижают показатели исследовательской активности. В частности, многослойные углеродные нанотрубки способствуют развитию депрессии поискового поведения, вплоть до полного отказа от поиска. Углеродные нановолокна подобного эффекта не вызывают.

6. Многослойные углеродные нанотрубки вызывают значительное повышение тревожности лабораторных животных, тогда как углеродные нановолокна в течение 10 дней эксперимента оказывают неоднозначное влияние на показатели тревожности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГМА	–	Амурская государственная медицинская академия
АгУНМ	–	агрегаты углеродных наноматериалов
АФК	–	активные формы кислорода
БЭТ	–	метод Брунауэра, Эммета и Теллера – метод математического описания физической адсорбции
ВНД	–	высшая нервная деятельность
ГЭБ	–	гемато-энцефалический барьер
ДВГИ ДВО РАН	–	Дальневосточный государственный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук
ДФУ	–	Дальневосточный федеральный университет
ЖКТ	–	желудочно-кишечный тракт
ИА	–	исследовательская активность
ИФА	–	иммуноферментный анализ
КП	–	когнитивный показатель
МДА	–	малоновый диальдегид
МУНТ	–	многостенные углеродные нанотрубки
НИИ	–	научно-исследовательский институт
ОП	–	«открытое поле»
ОСУНТ	–	одностенные углеродные нанотрубки
ПА	–	поисковая активность
ПАВ	–	поверхностно-активные вещества
ПКЛ	–	«приподнятый крестообразный лабиринт»
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
ПЭМ	–	просвечивающая электронная микроскопия
РДМ	–	радиальные дыхательные моды
СО РАН	–	Сибирское отделение Российской академии наук

теория ДЛФО	–	теория Дерягина – Ландау – Фервея – Овербека
УНВ	–	углеродные нановолокна
УНМ	–	углеродные наноматериалы
УНТ	–	углеродные нанотрубки
УПК	–	«универсальная проблемная камера»
ЦНС	–	центральная нервная система
ИЛ	–	интерлейкин
$M \pm m$	–	средняя арифметическая и среднее отклонение от нее соответственно
ppb	–	parts per billion (миллиардная доля – млрд$^{-1}$)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаева Л.Ф., Шумский В.И., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Любченко П.Н. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра // Альманах клинической медицины. 2010. № 22. С. 10–16.

2. Арчаков А.И. Нанобиотехнологии в медицине: нанодиагностика и нанолекарства // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56, № 1. С. 7–25.

3. Баталова Т.А. Психобиологические особенности при комплексной коррекции у крыс : дис. … д-ра биол. наук : 03.03.01 / ФГОУ ВПО «Дальневост. гос. аграр. ун-т». Благовещенск : [Б. и.], 2011. 197 с.

4. Баян Е.М., Лупейко Т.Г., Домницкий Н.К. Производство наноматериалов: потенциальные риски и пути их снижения // Технологии гражданской безопасности. 2015. Т. 12, № 2 (44). С. 74–78.

5. Бессалова Е.Ю. Половые и сезонные отличия поведения крыс в «открытом поле» // Світ медицини та біології. 2011. Т. 7, № 4. С. 12–16.

6. Бородин Е.А., Арчаков А.И. Стабилизация и реактивация цитохрома Р-450 фосфатидилхолином при перекисном окислении липидов // Биологические мембраны. 1987. № 7. С. 719–728.

7. Бирюкова А.Н. Поведение многослойных углеродных нанотрубок при моделировании сильного и слабого течения // Сборник докладов 63 - й международной молодежной научно – технической конференции. МОЛОДЕЖЬ. НАУКА. ИННОВАЦИИ. 2015. Т.1. С. 321

8. Бородкин Г.И. Нанотехнологии и экологическая безопасность // СИББЕЗОПАСНОСТЬ-СПАССИБ. 2011. № 1. С. 16–21.

9. Буслович С.Ю., Котеленец А.И., Фридлянд Р.М. Интегральный метод оценки поведения белых крыс в открытом поле // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 1989. Т. XXXIX, № 1. С. 168–171.

10. Вишневецкий В.Ю., Вишневецкий Ю.М. К возможности оценки влияния наноразмерных частиц как загрязняющих веществ на окружающую среду // Известия ЮФУ. Технические науки. 2008. № 5 (82). С. 226–229.

11. Власова И.И., Соколов А.В., Чеканов А.В., Костевич А.В., Васильев В.Б. Индуцированная миелопероксидазой деградация однослойных углеродных нанотрубок определяется синтезом гипохлорита // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37, № 4. С. 510–521.

12. Войтов Е.Л., Сколубович Ю.Л. Подготовка питьевой воды из водоисточников с высоким природным и техногенным загрязнением // СИББЕЗОПАСНОСТЬ – СПАССИБ. 2013. № 1. С. 47–55.

13. Гвоздовский В.И. Антропогенное воздействие на природные воды: экологические проблемы водных систем // Традиции и инновации в строительстве и архитектуре. Естественные науки и техносферная безопасность : сб. ст. / под ред. М.И. Бальзанникова, К.С. Галицкова, Ю.Э. Сеницкого ; Сам. гос. архитектур.-строит. ун-т. Самара : СГАСУ, 2016. С. 307–314.

14. Гинзбург Б.М., Елецкий А.В., Пиотровский Л.Б., Фалеев С.П., Фукс А.М. Актуальность развития нанотехнологий и наноиндустрии в России // Инноватика и экспертиза. 2008. № 1 (2). С. 42–47.

15. ГН 1.2.2633-10. Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды: утв. Постановлением Гл. гос. санитар. врача Рос. Федерации от 25.05.2010 № 60: введ. 25.07.2010. URL: 25.07.2010 http://snipov.net/c_4655_snip_58736.html (дата обращения: 12.01.2017).

16. Голохваст К.С., Кузнецов В.Л., Кусайкин М.И., Елумеева К.В., Мишаков И.В., Староконь Е.В., Чайка В.В., Никифоров П.А., Паничев А.М., Гульков А.Н. Влияние некоторых синтетических и природных наночастиц на развитие личинок морского ежа // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2013а. Т. V, № 2 (15). С. 36–39.

17. Голохваст К.С., Чайка В.В., Кузнецов Л.В., Елумеева К.В., Кусайкин М.И., Захаренко А.М., Киселев Н.Н., Паничев А.М., Рева Г.В., Усов В.В., Рева И.В., Ямамото Т., Гульков А.Н. Изучение влияния многослойных

углеродных нанотрубок при пероральном введении в течение 6 суток на желудочно-кишечный тракт и почки мышей линии СВА // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013б. Т. 155, № 6. С. 753–757.

18. Голохваст К.С., Чернышев В.В., Угай С.М. Твердые частицы выхлопных газов автомобилей: монография. Владивосток: ДВФУ, 2014. 108 с.

19. Голубева Н.И., Полищук С.Д. Токсичность различных наноматериалов при обработке семян яровой пшеницы // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П. А. Костычева. 2012. № 4 (16). С. 21–24.

20. Горшенева Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2014. Т. 6, № 1 (18). С. 48–55.

21. Григорьев Н.Р., Кириченко Е.Ф., Темпер Ю.Б., Чербикова Г.Е. Высшие функции мозга и основы физиологии поведения: Избранные лекции. Благовещенск: Амурская ГМА, 2006. 75 с.

22. Григорьев Н.Р. Метод количественной оценки поисковой активности и отказа от поиска в эксперименте у крыс // Журнал Высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 1996. Т. 46, № 2. С. 400–405.

23. Григорьев Н.Р. Функциональная организация поисковой активности (экспериментальное исследование): дис. … д-ра мед. наук. Благовещенск: [Б.и.], 1998. 249 с.

24. Гусев А.А., Акимова О.А., Крутяков Ю.А., Климов А.И., Денисов А.Н., Кузнецов Д.В., Годымчук А.Ю., Ихалайнен Е.С. Влияние высокодисперсных частиц различной природы на ранние стадии онтогенеза растений рапса (Brassica napus) // Интернет-журнал «Науковедение». 2013а. № 5 (18). С. 1–17.

25. Гусев А.А., Зайцева О.Н., Полякова И.А., Горшенева Е.Б., Емельянов А.В., Шутова С.В., Романцова С.В., Семилетова С.В., Ткачев А.Г., Пиляшенко Н.Е. Предварительные результаты комплексного биотестирования углеродного наноматериала – перспективного носителя лекарственных препаратов // Вестник Тамбовского университета. Серия «Естественные и Технические науки». 2010а. Т. 15, № 5. С. 1538–1540.

26. Гусев А.А., Полякова И.А., Горшенев Е.Б., А.Г. Ткачев, Емельянов А.В., Шутова С.В. Половые различия физиологического эффекта углеродного наноструктурного материала – перспективного носителя лекарственных препаратов в эксперименте на лабораторных мышах // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия «Естественные науки». 2010б. Т. 21, № 13. С. 107–112.

27. Гусев А.А., Родаев В.В., Васюкова И.А., Ткачев А.Г., Захарова О.В., Зрютина А.В. Исследование содержания аэрозольных наночастиц в воздухе рабочей зоны нанотехнологического производства и оценка воздействия наноматериала на бактерии на примере углеродного наноматериала «Таунит» // Вестник Тамбовского университета. Серия «Естественные и Технические науки». 2013б. Т. 18, № 1. С. 299–303.

28. Гуськов Е.П., Шкурат Т.П., Вардуни Т.В., Машкина Е.В., Покудина И.О., Шиманская Е.И., Гуськов Г.Е., Беличенко Н.И., Александрова А.А. Генетика окислительного стресса: монография. Ростов н/Д: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2009. 156 с.

29. Добрецов К.Г., Кириченко А.К., Столяр С.В., Инжеваткин Е.В., Ладыгина В.П., Пронина Ю.В., Ищенко Л.А., Столяр И.А. Морфологическая характеристика органов экспериментальных животных при внутривенном введении магнитных наночастиц // Сибирское медицинское обозрение. 2010. Т. 66, № 6. С. 34–37.

30. Дятлов И.А., Холоденко В.П., Потапов В.Д., Фирстова В.В., Чугунов В.А., Герасимов В.Н., Игнатов С.Г. Комплексная оценка безопасности наноматериалов для здоровья человека и среды его обитания // Здоровье населения и среда обитания. 2011. № 5. С. 26–28.

31. Евдокимов Ю.М. Несколько замечаний по поводу нанотехнологий // Экономические стратегии. 2008. Т. 10, № 7. С. 56–61.

32. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы // Казанский медицинский журнал. 2008. Т. 89, № 1. С. 1–7.

33. Ибраев С.А., Отаров Е.Ж., Жарылкасын Ж.Ж., Калишев М.Г., Жакетаева Н.Т. Влияние наночастиц на организм в производстве хризотила // Онкология. – XXI век: материалы XIX Междунар. науч. конф. «Онкология – XXI век», V Ит.-рос. науч. конф. по онкологии и эндокринной хирургии, XIX Междунар. науч. конф. «Здоровье нации – XXI век», Светлогорск, 28 апр. 03 мая 2015 г.: сб. тр. Светлогорск : Кн. формат, 2015. С. 155–159.

34. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А., Девришов Д.А., Копылов С.Н. Направленный транспорт лекарственных препаратов : Современное состояние вопроса и перспективы // Известия Коми Научного центра УРО РАН. 2012. № 9. С. 46–55.

35. Ильинский В.П., Аношин Е.А. Химическое загрязнение природных вод // Успехи современного естествознания. 2011. № 7. С. 116.

36. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // Биомедицина. 2009. № 1. С. 5–27.

37. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. 312 с.

38. Крученецкий В.З., Калабина А.А., Крученецкий В.В. К основным направлениям изучения и научных исследований наноматериалов, нанопродуктов // Вестник Алматинского технологического университета. 2013. № 2. С. 5–10.

39. Латышевская Н.И., Стрекалова А.С. Экологические проблемы развития нанотехнологий // Вестник Волгоградского государственного университета. Сер. 3, Экономика. Экология. 2011. Т. 3, № 1. С. 224–230.

40. Латюшин Я.В., Камскова Ю.Г., Мамылина Н.В., Павлова В.И. Влияние эмоционально-болевого стресса на поведенческую активность крыс в тесте «открытое поле» // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура». 2006. № 3–1. С. 178–179.

41. Левандовская А.А., Зайченко М.И., Мержанова Г.Х., Саложин С.В. Оценка исследовательской активности и тревожности крыс, различающихся по

выраженности импульсивного поведения // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2013. Т. 63, № 6. С. 719–729.

42. Лямзаев К.Г. Митохондрии при окислительном стрессе в культуре клеток HeLa: автореф. дис. … канд. биол. наук. М.: [Б.и.], 2007. 25 с.

43. Мамчиц Л.П., Чайковская М.А., Бортновский В.Н. Развитие нанотехнологий в профилактической медицине в республике Беларусь // Проблемы здоровья и экологии. 2014. № 1 (39). С. 131–136.

44. Мамылина Н.В., Павлова В.И. Физиологические аспекты поведенческой активности животных в условиях эмоционального стресса: монография. Челябинск: издИзд-во ЗАО «Цицеро», 2013. 298 с.

45. Мешалкин Ю.П., Бгатова Н.П. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии (обзор) // Журнал сибирского Сибирского федерального университета. Серия «Биология». 2008. Т. 1, № 3. С. 248–268.

46. Муртазина Э.М., Лефтерова О.И. Основные вехи в развитии нанотехнологии (обзор зарубежных публикаций) // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15, № 10. С. 45–49.

47. Николаев Б.П., Яковлева Л.Ю. Концепция гипобиоза и проблема биобезопасности наноматериалов // Биотехносфера. 2009. № 3. С. 12–17.

48. Пат. 2432902 Российская Федерация, МПК A61B5/16, G09B23/28 Проблемная камера для измерения индивидуального уровня когнитивных способностей крыс / Григорьев Н. Р., Чербикова Г. Е., Юрьев Е. Ю.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Амурская ГМА Росздрава. Заявл. 17.11.2009; опубл. 10.11.2011.

49. Подколодная О.А., Игнатьева Е.В., Подколодный Н.Л., Колчанов Н.А. Пути поступления наночастиц в организм млекопитающих, их биосовместимость и клеточные эффекты // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 1. С. 3–15.

50. Поляков В.В., Старченко И.Б., Джуплина Г.Ю. Перспективы применения нанотехнологий в биомедицинской инженерии // Известия Южного

Федерального федерального Университетауниверситета. Технические науки. 2008. Т. 82, № 5. С. 216–220.

51. Попов Е.М. Эколого-экономическое обоснование перспективности развития технологий, основанных на применении самых распространенных наночастиц // Научный вестник Московского государственного горного университета. 2013. № 11. С. 194–198.

52. Приказ МЗ СССР от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». URL: http://primatologia.ru/images/NII/GLP/3_2_prikaz_minzdrawa_o_merah_zhiwotnyh.pdf (дата обращения: 24.01.2017).

53. Романова Л.А., Стальная И.Д. Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоционата аммония // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 64–66.

54. Сахаров Д.С., Каркищенко Н.Н., Филиппов А.А., Рыжков А.В. Анализ когерентности ЭЭГ крыс после интраперитонеального введения фторсодержащих производных фуллерена-60 // Биомедицина. 2010. № 1. С. 24–32.

55. Сейфулла Р.Д., Суслина З.А., Куликова Е.В., Ким Е.К., Тимофеев А.Б., Иллариошкин С.Н., Рожкова Е.А. Перспективы применения нанотехнологий в клинической неврологии // Анналы клинической и экспериментальной неврологии . 2008. Т. 2, № 2. С. 35–44.

56. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / под ред. Ореховича В.Н. М.: Медицина, 1977. С. 63–64.

57. Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г. Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте «Фогеля» // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156, № 10. С. 489–493.

58. Супотницкий М.В., Паныгина С.А., Поклонский Д.Л., Волков М.Ю. Оценка потенциальной биологической опасности наночастиц // Ветеринарная медицина. 2009. № 3. С. 12–15.

59. Трофимова Н.В., Макаренко О.Н., Колесников О.Л., Колбин И.А. Оценка степени изменения фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов при инкубации с углеродными нанотрубками // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012. № 2 (39). С. 120–121.

60. Трофимова С.А. Методологические подходы к оценке биологического действия наноматериалов // Journal of biomedical technologies. 2015. № 1. С. 38–44. URL: http://jbiomedtech.petrsu.ru/journal/article.php?id=3283 (дата обращения: 20.05.2017).

61. Тутурова К.В. Загрязнение и охрана природных вод // Интеллектуальный и научный потенциал XXI века: сб. ст. междунар. науч.-прак. конф., Казань, 20 дек. 2016 г.: в 6 ч. / отв. ред. Сукиасян А. А. Уфа: Аэтерна, 2016. Ч. 6. С. 87–88.

62. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казанский медицинский журнал. 2009. Т. 90, № 4. С. 578–584.

63. Фирстова В.В., Потапов В.Д., Герасимов В.Н., Полежаева О.В., Зырина Е.В. Влияние углеродных нанотрубок на жизнеспособность спленоцитов и субпопуляционный состав лимфоцитов мышей линии BALB/C в зависимости от пути их проникновения в организм // Здоровье населения и среда обитания. 2011. № 5. С. 36–39.

64. Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации. Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования: принята на 18-й Ген. ассамблее Всемир. мед. ассоциации (World Medical Association – WMA), Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г. URL: http://www.sgmu.ru/sci/ethical/files/hd.pdf (дата обращения: 20.05.2017).

65. ЦВ 3.18.05-2005. ФР.1.31.2005.01714. Качество воды. Методика выполнения измерений элементного состава питьевых, природных, сточных вод и атмосферных осадков методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно связанной плазме. СПб.,2005. 22 с. URL: http://meganorm.ru/Index2/1/4293764/4293764553.htm (дата обращения: 20.05.2017).

66. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Кайгородова Е.В., Чечина О.Е., Соколович Е.Г., Новицкий В.В. и др. Состояние системы МАР-Киназ JNK и p38 в в мононуклеарных лейкоцитах крови при воспалении // Медицинская Иммунологияиммунология. 2009. Т. 11, № 6. С. 515–522.

67. Ясенявская А.Л., Самотруева М.А., Лужнова С.А. Психотропные эффекты α-токоферола в условиях иммобилизационного стресса // Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. XX, № 2. С. 354–358.

68. Яузина Н.А., Комлева Ю.К., Салмина А.Б. Современные экспериментальные модели депрессии // Биомедицина. 2013. Т. 1, № 1. С. 61–77.

69. Akhtar M.J., Ahamed M., Khan M.A., Alrokayan S.A., Ahmad I., Kumar S. Cytotoxicity and apoptosis induction by nanoscale talc particles from two different geographical regions in human lung epithelial cells // Environmental Toxicology. 2014. Vol. 29, No. 4. P. 394–406.

70. Andón F.T., Kapralov A.A., Yanamala N., Feng W., Baygan A., Chambers B.J., Hultenby K., Ye F., Toprak M.S., Brandner B.D., Fornara A., Klein-Seetharaman J., Kotchey G.P., Star A., Shvedova A.A., Fadeel B., Kagan V.E. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes by eosinophil peroxidise // Small. 2013. Vol. 9, No. 16. P. 2721–2729.

71. Bandyopadhyaya R., Nativ-Roth E., Regev O., Yerushalmi-Rozen R. Stabilization of individual carbon nanotubes in aqueous solutions // Nano letters. 2002. Vol. 2, No. 1. P. 25–28.

72. Baştuğ M., Ayhan S., Turan B. The effect of altered selenium and vitamin E nutritional status on learning and memory of third-generation rats // Biological trace element research. 1998. Vol. 64, No. 1–3. P. 151–160.

73. Belyanskaya L., Weigel S., Hirsch C., Tobler U., Krug H.F., Wick P. Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells // Neurotoxicology. 2009. Vol. 30, No. 4. P. 702–711.

74. Boncel S., Kyzioł-Komosińska J., Krzyżewska I., Czupioł J. Interactions of carbon nanotubes with aqueous/aquatic media containing organic/inorganic contaminants and selected organisms of aquatic ecosystems: A review // Chemosphere. 2015. No. 136. P. 211–221.

75. Campagnolo L., Massimiani M., Palmieri G., Bernardini R., Sacchetti C., Bergamaschi A., Vecchione L., Magrini A., Bottini M., Pietroiusti A. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice // Particle and Fibre Toxicology. 2013. Vol. 10, No. 21. 13 p.

76. Carabotti M., Scirocco A., Maselli M.A., Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems // Annals of gastroenterology. 2015. Vol. 28, No. 2. P. 203–209.

77. Castranova V., Schulte P.A., Zumwalde R.D. Occupational nanosafety considerations for carbon nanotubes and carbon nanofibers // Accounts of Chemical Research. 2013. Vol. 46, No. 3. P. 642–649.

78. Chen D., Stueckle T.A., Luanpitpong S., Rojanasakul Y., Lu Y., Wang L. Gene expression profile of human lung epithelial cells chronically exposed to single-walled carbon nanotubes // Nanoscale Research Letters. 2015. Vol. 10. 12 p.

79. Costa S., Borowiak-Palen E., Kruszynska M., Bachmatiuk A., Kalenczuk R.J. Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy // Mater. Sci.-Pol. 2008. No. 26. P. 433–441.

80. Costa P.M., Fadeel B. Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk // Toxicology and Applied Pharmacology. 2016. Vol. 299. P. 201–211.

81. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. – Electron text data. URL: http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1986/609/oj (data of access: 13.04.2016).

82. Cryan J.F., Dinan T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the the gut gut microbiota microbiota on on brain brain and and behaviour // Nature reviews. Neuroscience. 2012. Vol. 13, No. 10. P. 701–712.

83. Cui Y., Chen X., Zhou Z., Lei Y., Ma M., Cao R., Sun T., Xu J., Huo M., Cao R., Wen C., Che Y. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats // Chemosphere. 2014. Vol. 96. P. 99–104.

84. Dahm M.M., Schubauer-Berigan M.K., Evans D.E., Birch M.E., Fernback J.E., Deddens J.A. Carbon nanotube and nanofiber exposure assessments: an analysis of 14 site visits // Annals of Occupational Hygiene. 2015. Vol. 59, No. 6. P. 705–723.

85. Dal Bosco L., Weber G.E.B., Parfitt G.M., Paese K., Gonçalves C.O.F., Serodre T.M., Fu Bosco rtado C.A., Santos A.P., Monserrat J.M., Barros D.M. PEGylated carbon nanotubes impair retrieval of contextual fear memory and alter oxidative stress parameters in the rat hippocampus // BioMed Research International. 2015. Vol. 2015. P. 104–135.

86. Darne C., Terzetti F., Coulais C., Fontana C., Binet S., Gaté L., Guichard Y. Cytotoxicity and genotoxicity of panel of single- and multiwalled carbon nanotubes: In vitro effects on normal syrian hamster embryo and immortalized V79 hamster lung cells // Journal of Toxicology. 2014. Vol. 8. 15 p.

87. 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 // Toxicological Sciences. 2012. Vol. 128, No. 2. P. 449–460.

88. Douroumis D., Fatouros D.G., Tasis D., Bouropoulos N., Papagelis K. Colloidal stability of carbon nanotubes in anaqueous dispersion of phospholipid // International Journal of Nanomedicine. 2007. Vol. 2, No. 4. P. 761–766.

89. Dowlati Y., Herrmann N., Swardfager W., Liu H., Sham L., Reim E.K., Lanctôt K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression // Biological psychiatry. 2010. Vol. 67, No. 5. P. 446–457.

90. Ema M., Gamo M., Honda K. Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents // Toxicology and applied pharmacology. 2016. Vol. 299. P. 47–52.

91. Engin A.B., Neagu M., Golokhvast K.S., Tsatsakis A. Nanoparticles and endothelium: An update on the toxicological interactions // Farmacia. 2015. Vol. 63, No. 6. P. 792–804.

92. Feng X., Chen A., Zhang Y., Wang J., Shao L., Wei L. Application of dental nanomaterials: potential toxicity to the central nervous system // International journal of nanomedicine. 2015. Vol. 10, No. 1. P. 3547–3565.

93. Feng L., Xie N., Zhong J. Carbon Nanofibers and Their Composites: A Review of Synthesizing, Properties and Applications // Materials. 2014. Vol. 7, No. 5. P. 3919–3945.

94. Fröhlich E., Roblegg E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products // Toxicology. 2012. Vol. 291, No. 1–3. P. 10–17.

95. Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species // Journal of Food and Drug Analysis. 2014. Vol. 22, No. 1. P. 64–75.

96. Gądek-Michalska A., Tadeusz J., Rachwalska P., Bugajski J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems // Pharmacological reports. 2013. Vol. 65, No. 6. P. 1655–1662.

97. Gershon M.D. The Second Brain: The Scientific Basis of Gut Instinct and Groundbreaking New Understanding of Nervous Disorders of the Stomach and Intestines. HarperCollins, 1998. 336 p.

98. Gómez-Lázaro E., Arregi A., Beitia G., Vegas O., Azpiroz A., Garmendia L. Individual differences in chronically defeated male mice: behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress // Stress: the international journal on the biology of stress. 2011. Vol. 14, No. 5. P. 537–548.

99. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // Journal of Comparative Psychology. 1934. Vol. 18, No. 3. P. 385–403.

100. Hsieh H.L., Yang C.M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases // BioMed research international. 2013. 18 p.

101. Hu R., Gong X., Duan Y., Li N., Che Y., Cui Y., Zhou M., Liu C., Wang H., Hong F. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO2 nanoparticles // Biomaterials. 2010. Vol. 31, No. 31. P. 8043–8050.

102. Ivani S., Karimi I., Tabatabaei S.R., Syedmoradi L. Effects of prenatal exposure to single-wall carbon nanotubes on reproductive performance and neurodevelopment in mice // Toxicology and Industrial Health. 2016. Vol. 32, No. 7. P. 1293–1301.

103. Kagan V.E., Kapralov A.A., Croix C.M.St., Watkins S.C., Kisin E.R., Kotchey G.P., Balasubramanian K., Vlasova I.I., Yu J., Kim K., Seo W., Mallampalli R.K., Star A., Shvedova A.A. Lung macrophages “Digest” carbon nanotubes using a superoxide/peroxynitrite oxidative pathway // American Chemical Society Nano. 2014. Vol. 8, No. 6. P. 5610–5621.

104. Kuznetsov V.L., Elumeeva K.V., Ishchenko A.V., Beylina N.Yu., Stepashkin A.A., Moseenkov S.I., Plyasova L.M., Molina I.Yu., Romanenko A.I., Anikeeva O.B., Tkachev E.N. Multi-walled carbon nanotubes with ppm level of impurities // Physica Status Solidi (b). 2010. Vol. 247, No. 11–12. P. 2695–2699.

105. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Arepalli S., Hunter R.L. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks // Critical Reviews in Toxicology. 2006. Vol. 36, No. 3. P. 189–217.

106. Lee S., Khang D., Kim S.H. High dispersity of carbon nanotubes diminishes immunotoxicity in spleen // International journal of nanomedicine. 2015a. No. 10. P. 2697–2710.

107. Lee S.H., Lee H.Y., Lee E.J., Khang D., Min K.J. Effects of carbon nanofiber on physiology of Drosophila // International Journal of Nanomedicine. 2015b. Vol. 10. P. 3687–3697.

108. Liu X., Zhang Y., Li J., Wang D., Wu Y., Li Y., Lu Z., Yu S. C., Li R., Yang X. Cognitive deficits and decreased locomotor activity induced by single-walled

carbon nanotubes and neuroprotective effects of ascorbic acid // International journal of nanomedicine. 2014. Vol. 9, No. 1. P. 823–839.

109. Lopes S., Pinheiro C., Soares A.M.V.M., Loureiro S. Joint toxicity prediction of nanoparticles and ionic counterparts: Simulating toxicity under a fate scenario // Journal of Hazardous Materials. 2016. Vol. 320. P. 1–9.

110. Lovern S.B., Strickler J. R., Klaper R. Behavioral and physiological changes in Daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx) // Environmental science & technology. 2007. Vol. 41, No. 12. P. 4465–4470.

111. Ma P., Liu X., Wu J., Yan B., Zhang Y., Lu Y., Wu Y., Liu C., Guo J., Nanberg E., Bornehag C.G., Yang X. Cognitive deficits and anxiety induced by diisononyl phthalate in mice and the neuroprotective effects of melatonin // Scientific reports. 2015. 14 p. URL: http://www.readcube.com/articles/10.1038/srep14676 170 (data of access: 11.02.2017).

112. Maes M., Berk M., Goehler L., Song C., Anderson G., Gałecki P., Leonard B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways // BMC medicine. 2012. URL: http://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-10-66 (data of access: 11.09.2016).

113. Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J.W., Celio M., Catsicas S., Schwaller B., Forró L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials // Nano Lett. 2006 Jun. Vol. 6 (6). P. 1121–1215.

114. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. Pulmonary toxicity and fibrogenic response of carbon nanotubes // Toxicology mechanisms and method. 2013. Vol. 23, No. 3. P. 196–206.

115. Massaad C.A., Klann E. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory // Antioxidants & redox signaling. 2011. Vol. 14, No. 10. P. 2013–2054.

116. Matarredona O., Rhoads H., Li Zh., Harwell J.H., Balzano L., Resasco D.E. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in aqueous solutions of the anionic surfactant NaDDBS // J. Phys. Chem. B. 2003. No. 107. P. 13357–13367.

117. McGillicuddy E., Murray I., Kavanagh S., Morrison L., Fogarty A., Cormican M., Dockery P., Prendergast M., Rowan N., Morris D. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology (Review) // Science of the Total Environment. 2017. Vol. 575. P. 231–246.

118. Morimoto Y., Horie M., Kobayashi N., Shinohara N., Shimada M. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles // Accounts of Chemical Research. 2013. Vol. 46, No. 3. P. 770–781.

119. Murphy F.A., Schinwald A., Poland C.A., Donaldson K. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells // Particle and fibre toxicology. 2012. URL: http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-9-8190 (data of access: 11.09.2016).

120. 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 // Particle and Fibre Toxicology. 2012. Vol. 9. URL: http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com /articles/10.1186/1743-8977-9-10 (data of access: 11.09.2016).

121. Oberdörster G., Castranova V., Asgharian B., Sayre P. Inhalation exposure to carbon nanotubes (CNT) and carbon nanofibers (CNF): Methodology and dosimetry // Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B. Critical Reviews. 2015. Vol. 18, No. 3–4. P. 121–212.

122. Osipov V.Yu., Baranov A.V., Ermakov V.A., Makarova T.L., Chungong L.F., Shames A.I., Takai K., Enoki T., Kaburagi Y., Endo M., Ya A. Vul' Raman characterization and UV optical absorption studies of surface plasmon resonance in multishell nanographite // Diamond and Related Materials. 2011. Vol. 20, Issue 2. P. 205–209.

123. Patel H., Kwon S. Multi-walled carbon nanotube – induced inflammatory response and oxidative stress in a dynamic cell growth environment // Journal of biological engineering. 2012. Vol. 6, No. 22. URL: https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-1611-6-22 (data of access: 12.05.2016).

124. Patlolla A., McGinnis B., Tchounwou P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotubes in Swiss-Webster mice // Journal of applied toxicology. 2011. Vol. 31, No. 1. P. 75–83.

125. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // Journal of neuroscience methods. 1985. Vol. 14, No. 3. P. 149–167.

126. Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Gialeli C., Docea A.O., Vynios D.H., Pavo M.S.G., Golokhvast K.S., Shtilman M.I., Argiris A., Shishatskaya E., Tsatsakis A.M. Emerging aspects of nanotoxicology in health and disease: from agriculture and food sector to cancer therapeutics // Food and Chemical Toxicology. 2016. Vol. 91. P. 42–57.

127. Poulsen S.S., Saber A.T., Williams A., Andersen O., Købler C., Atluri R., Pozzebon M.E., Mucelli S.P., Simion M., Rickerby D., Mortensen A., Jackson P., Kyjovska Z.O., Mølhave K., Jacobsen N.R., Jensen K.A., Yauk C.L., Wallin H., Halappanavar S., Vogel U. MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differenceApplics in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs // Toxicology and Applied Pharmacology. 2015. Vol. 284, No. 1. P. 16–32.

128. Sharifi S., Behzadi S., Laurent S., Forrest M.L., Stroeve P., Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials // Chemical Society reviews. 2012. Vol. 41, No. 6. P. 2323–2343.

129. Shvedova A.A., Pietroiusti A., Fadeel B., Kagan V.E. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress // Toxicology and Applied Pharmacology. 2012. Vol. 261, No. 2. P. 121–133.

130. Shvedova A.A., Yanamala N., Kisin E.R., Tkach A.V., Murray A.R., Hubbs A., Chirila M.M., Keohavong P., Sycheva L.P., Kagan V.E., Castranova V. Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year postexposure comparisons // American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. 2014. Vol. 306, No. 2. P. 170–182.

131. Sohaebuddin S.K., Thevenot P.T., Baker D., Eaton J.W., Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent // Particle and fibre toxicology. 2010. URL: https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com /articles/10.1186/1743-8977-7-22 (data of access: 12.05.2016).

132. Sorce S., Krause K.H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease // Antioxidants & redox signaling. 2009. Vol. 11, No. 10. P. 2481–2504.

133. Teeguarden J.G., Webb-Robertson B.J., Waters K.M., Murray A.R., Kisin E.R., Varnum S.M., Jacobs J.M., Pounds J.G., Zanger R.C., Shvedova A.A. Comparative proteomics and pulmonary toxicity of instilled single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultrafine carbon black in mice // Toxicological Sciences. 2011. Vol. 120, No. 1. P. 123–135.

134. Tilson H. A. Behavioral indices of neurotoxicity: what can be measured? // Neurotoxicology and teratology. 1987. Vol. 9, No. 6. P. 427–443.

135. Voorhees J.L., Tarr A.J., Wohleb E.S., Godbout J.P., Mo X., Sheridan J.F., Eubank T.D., Marsh C.B. Prolonged Restraint Stress Increases IL-6, Reduces IL-10, and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10 // PLOS ONE. 2013. URL: http://journals.plos.org/plosone/article?id =10.1371/journal.pone.0058488 (data of access: 12.10.2016).

136. Walther J.H., Jaffe R., Halicioglu T., Koumoutsakos P. Molecular dynamics simulations of carbon nanotubes in water // Center for Turbulence Research Proceedings of the Summer Program. 2000. P. 5–20.

137. Wang X., Katwa P., Podila R., Chen P., Ke P.C., Rao A.M., Walters D.M., Wingard C.J., Brown J.M. Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice // Particle and Fibre Toxicology. 2011a. P. 1–13. URL:

http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-8-24 (data of access: 12.12.2016).

138. Wang J., Sun P., Bao Y., Dou B., Song D., Li Y. Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walledcarbon nanotubes // Toxicol In Vitro. 2012. Vol. 26, No. 1. P. 32–41.

139. Wang J., Sun P., Bao Y., Liu J., An L. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells // Toxicol In Vitro. 2011b. Vol. 25, No. 1. P. 242–250.

140. Wang X., Qu R., Allam A.A., Ajarem J., Wei Z., Wang Z. Impact of Carbon Nanotubes on the Toxicity of Inorganic Arsenic [As(III) and As(V)] to Daphnia magna: The Role of the Certain Arsenic Species // Environmental toxicology and chemistry. 2016a. Vol. 35, No. 7. P. 1852–1859.

141. Wang X., Qu R., Liu J., Wei Z., Wang L., Yang S., Huang Q., Wang Z. Effect of different carbon nanotubes on cadmium toxicity to Daphnia magna: The role of catalyst impurities and adsorption capacity // Environmental Pollution. 2016b. Vol. 208, Part B. P. 732–738.

142. Williamson L.L., Bilbo S.D. Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability // Brain, behavior, and immunity. 2013. Vol. 30. P. 186–194.

143. Yanamala N., Kagan V.E., Shvedova A.A. Molecular modeling in structural nano-toxicology : Interactions of nano-particles with nano-machinery of cells // Advanced Drug Delivery Reviews. 2013. Vol. 65 (15). P. 2070–2077.

144. Yan L., Gu Z., Zhao Y. Chemical mechanisms of the toxicological properties of nanomaterials: generation of intracellular reactive oxygen species // Chemistry an Asian Journal. 2013. Vol. 8, No. 10. P. 2342–2353.

145. Yang Z., Zhang Y., Yang Y., Sun L., Han D., Li H., Wang C. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease // Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine. 2010. Vol. 6, No. 3. P. 427–441.

146. Yirmiya R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats // Brain research. 1996. Vol. 711, No. 1–2. P. 163–174.