Федеральное бюджетное учреждение науки «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

СУТУНКОВА Марина Петровна

ОБОСНОВАНИЕ КРИТЕРИЕВ ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ И МЕТОДОВ УПРАВЛЕНИЯ РИСКОМ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ, СОЗДАВАЕМЫМ МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИМИ НАНОЧАСТИЦАМИ 14.02.01 - гигиена

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты: д.м.н. Гурвич Владимир Борисович засл. деятель науки РФ, д.м.н., проф. Кацнельсон Борис Александрович

Екатеринбург 2019

оглавление

ВВЕДЕНИЕ5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ17
1.1. Современное состояние проблемы токсичности наночастиц17
1.2. Теоретическое обоснование выбора биопротекторов
Резюме35
ГЛАВА 2. ОБЩАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ36
2.1. Характеристика частиц, используемых в экспериментах
2.2. Методика экспериментальных исследований43
Резюме
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА РЕАКЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ФАГОЦИТОЗА НА
ОТЛОЖЕНИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ/МЕТАЛЛООКСИДНЫХ
НАНОЧАСТИЦ В ГЛУБОКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЯХ63
3.1. Цитологические и биохимические характеристики жидкости
бронхоальвеолярного лаважа64
3.2. Изучение топографии поверхности фагоцитирующих клеток
3.3. Внутриклеточная ультраструктура фагоцитирующих клеток93
Резюме105
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СУБХРОНИЧЕСКОГО
ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И
МЕТАЛЛООКСИДНЫХ ЧАСТИЦ ОТ ИХ РАЗМЕРА И ХИМИЧЕСКОГО
СОСТАВА106
4.1. Сравнительная оценка токсичности частиц разных размеров108
4.1.1. Оценка токсического действия частиц магнетита трех
размеров108
4.1.2. Оценка субхронического токсического действия наночастиц
оксида никеля двух размеров123
4.1.3. Оценка генотоксического эффекта медьсодержащих частиц двух
размеров134

4.2. Сравнительная оценка субхронической токсичности наночастиц разной
химической природы136
4.3 Подходы к обоснованию ориентировочно безопасных уровней
воздействия (ОБУВ) металлсодержащих наночастиц149
Резюме154
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ
ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И ОКСИДА НИКЕЛЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ
ИНГАЛЯЦИОННЫХ ЭКСПОЗИЦИЯХ156
5.1. Оценка хронической ингаляционной токсичности наночастиц
Fe ₂ O ₃ 157
5.2. Оценка хронической ингаляционной токсичности наночастиц NiO175
5.3. Некоторые общие соображения о задачах и условиях проведения
хронических ингаляционных экспериментов с наноразмерными
аэрозолями
Резюме
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ213
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ. 213 6.1. Оценка зависимости токсичности наночастиц от их растворимости по образующему наночастицу элементу. 213 6.2. Построение и идентификация многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной ткани. 215 6.3. Апробация многокамерной токсикокинетической модели при
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ. 213 6.1. Оценка зависимости токсичности наночастиц от их растворимости по образующему наночастицу элементу. 213 6.2. Построение и идентификация многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной ткани. 215 6.3. Апробация многокамерной токсикокинетической модели при внутрибрюшинном введении наночастиц. 239 Резюме. 248 ГЛАВА 7. АПРОБАЦИЯ СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ. 213 6.1. Оценка зависимости токсичности наночастиц от их растворимости по образующему наночастицу элементу. 213 6.2. Построение и идентификация многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной ткани. 215 6.3. Апробация многокамерной токсикокинетической модели при внутрибрюшинном введении наночастиц. 239 Резюме. 248 ГЛАВА 7. АПРОБАЦИЯ СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА К ТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ НЕКОТОРЫХ
ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	260	
выводы	277	
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ		
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ		
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		

введение

Актуальность темы исследования

Глобализация развития нанотехнологий требует внимания к проблемам гигиенической оценки риска, создаваемого воздействием наночастиц, обусловленным производством и применением наноматериалов. В настоящее время комплексные национальные программы развития наноиндустрии приняты и выполняются в более, чем 60 странах (таких как США, Япония, страны Евросоюза, Россия, Белоруссия, в ряде стран Азии и Ближнего Востока, а также в ряде международных (ВОЗ, ФАО, ILSI и др.) и национальных (FDA и EPA в США и др.) организаций).

В связи с этим, изучение наноматериалов является одной из «горячих точек» в сфере токсиколого-гигиенических исследований не только за рубежом, но и в России (Фатхутдинова Л.М. с соавт., 2009; Зайцева Н.В. с соавт., 2012; Землянова М.А. с соавт., 2013; Кацнельсон Б.А. с соавт., 2014; 2015; 2017; Гмошинский И.В. с соавт., 2016; Минигалиева И.А. с соавт., 2016; Разумов И.А. с соавт., 2017; Ромащенко А.В. и соавт., 2017; Соловьева С.Н. с соавт., 2017; Зайцева Н.В. с соавт., 2018; Минигалиева И.А. и соавт., 2018). Эти исследования имеют важнейшее значение как рамках оценки В риска, создаваемого производством и применением таких материалов, так и потому, что частицы (HH)нанометрового диапазона составляют существенную фракцию В аэрозольном загрязнении атмосферного воздуха и воздуха рабочих помещений ряда отраслей промышленности (Уланова Т.С. с соавт., 2015; Гурвич В.Б. с соавт., 2016). В национальном стандарте Российской Федерации ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 «Воздух рабочей зоны. Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц И наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании» указаны более 30 потенциальных источников некоторых групп наноаэрозолей, однако это далеко не все.

Хотя проблема риска для здоровья, создаваемая загрязнением воздушной среды наночастицами широко обсуждается в научной литературе (например, Потапов А.И. с соавт., 2011; Murashov V. et al., 2011; Yokel R.A. et al., 2011; Кацнельсон Б.А. с соавт., 2014; Зайцева Н.В. с соавт., 2016; Чащин В.П. с соавт., 2016; Минигалиева И.А. с соавт., 2017), однако общая методология обоснования соответствующих гигиенических стандартов все еще отсутствует (Сопова Е.А. с соавт., 2010; Grosco A. et al., 2010; Тутельян В.А. с соавт., 2011; Гуськова О.А. и соавт., 2013; Землянова М.А. с соавт., 2014; Глушкова А.В. с соавт., 2016; Ковалева Н.Ю., 2017).

Поэтому для углубления теоретических основ оценки риска для здоровья, связанных со свойствами наночастиц, производством и применением металлсодержащих наноматериалов, а также с образованием соответствующих НЧ и их гигиенического нормирования, изучение токсичности металлсодержащих НЧ является особо важным (Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О., 2010; Онищенко Г.Г., 2011; Филатов Б.Н. и соавт., 2015; Радилов А.С. и соавт., 2016; Леоненко H.C., 2016, De Matteis V. et al., 2019).

Степень разработанности темы исследования

3a публиковалось большое последние годы количество работ ПО экспериментальной безопасности металлсодержащих ΗЧ оценке (кроме приведенных выше еще, например, Hussain S.M. et al., 2006; Mahmoudi M. et al., 2009; Li et al., 2010; Markides H. et al., 2012; Soenen S.J. et al., 2012; Barhoumi L. et al., 2013; Gomes T. et al., 2013; Liu G. et al., 2013; Capasso L. et al., 2014; Theodorou I.G. et al., 2016; Шипелин В.А. и соавт., 2018; Zhang M.et al., 2019; Wu D. et al., 2019). Однако подавляющем большинстве исследований В оценивается цитотоксичность и генотоксичность in vitro и все еще недостаточно - на животных *in vivo*.

Существенное значение имеет вопрос о том, какие характеристики этих материалов играют ключевую роль:

- связанные с наноразмерностью частиц любого химического состава как таковой (высокий процент отложения их в глубоких дыхательных путях, способность к пенетрации через биологические барьеры, перенос с лимфой и кровью в отдаленные органы с задержкой в них, проникновение внутрь клеток и клеточных органелл, огромная удельная поверхность, особый характер протекающих на ней физических взаимодействий и химических процессов, с которыми связаны механизмы повреждающего действия на субклеточном и клеточном уровнях);

- или же химическая природа вещества, определяющая важные механизмы его вредного действия как в ионно-молекулярной форме, так и при отложении в организме в виде частиц различного размера;

- также предметом дискуссии остается вопрос о том, определяется ли токсичность действием наночастиц как таковых или перешедшими в раствор соответствующими ионами.

Один из способов приблизиться к пониманию процессов токсикокинетики вещества, накопления его в органах и тканях, выведения из организма и его вредного действия является создание и идентификация математической модели.

В 1991 г была создана многокамерная модель кинетики задержки практически нерастворимых полидисперсных частиц в легких и региональных лимфоузлах, которая многократно использовалась в исследованиях и хорошо зарекомендовала себя при описании особенностей кинетики ряда цитотоксичных пылей при различных сопутствующих факторах (Привалова Л.И. с соавт., 1990; Katsnelson B.A. et al., 1992; 1994; 1997). Однако данная модель не учитывает ряд особенностей кинетики частиц наноразмерного диапазона, таких как влияние дисперсности НЧ на накопление в органах и тканях, влияние растворимости НЧ в биожидкостях на их кинетику, способность НЧ к прямой пенетрации из мест первичного отложения в кровоток с последующей задержкой во внутренних органах, в особенности в органах, богатых клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), в частности, в селезенке и печени.

Особая потенциальная опасность металлсодержащих наночастиц обусловливает высокую целесообразность поиска возможности сделать организм менее чувствительным к их вредному действию с помощью комплекса неспецифических и специфических биопротекторов, которые в профилактически эффективных дозах не имели бы собственных побочных эффектов. Общая концепция такой «биологической профилактики», теоретические предпосылки и ее реализация, разрабатывается в отделе токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора более 30 лет (Кацнельсон Б.А. и соавт. 1995; Кацнельсон Б.А. с соавт., 2005; Привалова Л.И. с соавт., 2008; 2009), что позволило применить ее принципы и методы в отношении наночастиц.

Диссертационная работа выполнена в рамках отраслевых научноисследовательских программ: «Гигиеническое обоснование минимизации рисков для здоровья населения России» на период 2011-2015 гг. и «Гигиеническое научное обоснование минимизации рисков здоровью населения России» на 2016-2020 гг.

Работа одобрена Локальным независимым этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Цель исследования

Выявить наиболее общие закономерности вредного действия на организм наночастиц и связь с их физико-химическими характеристиками для обоснования критериев гигиенического нормирования и биопрофилактические методы управления риском для здоровья, создаваемым этим действием.

Задачи исследования

1. Оценить в токсиколого-гигиенических исследованиях наиболее общие закономерности вредного действия на организм наночастиц и влияние их химической природы, размера, растворимости (в том числе в пределах нанометрового диапазона) на биологическую агрессивность на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях;

 Рассмотреть общие принципы гигиенической регламентации металлсодержащих наночастиц на основании проведенных экспериментальных исследований;

3. Рассмотреть использование метода экстраполяции и интерполяции с имеющим норматив микрометровым аналогом ПО химической природе применительно к гигиенической регламентации наночастиц на основании сравнительной оценки реагирования защитно-компенсаторных механизмов организма;

4. Научно обосновать применимость количественной оценки реакции глубоких дыхательных путей на отложение микро- и наночастиц по цитологическим и биохимическим показателям жидкости, получаемой при бронхо-альвеолярном лаваже в качестве одного из ускоренных методов оценки токсического действия наночастиц *in vivo* для гигиенического нормирования;

 Обосновать среднесменную предельно допустимую концентрацию наночастиц диЖелезо триоксида в воздухе рабочей зоны по результатам хронического ингаляционного эксперимента;

6. Построить теоретически обоснованную многокамерную модель для математического описания и прогнозирования задержки металлсодержащих наночастиц в легких при хронической ингаляционной экспозиции и сопоставить модельные прогнозы с результатами экспериментов;

7. Обосновать выбор комплексов безвредных биопротекторов, тормозящих развитие вредных эффектов действия наночастиц на организм, и апробировать защитную эффективность этих биопрофилактических комплексов в токсикологических экспериментах с некоторыми металлсодержащими наночастицами как способ управления риском здоровью.

Научная новизна

Обосновано использование в гигиенической оценке для регламентации металлсодержащих наночастиц таких их свойств как размер, химическая природа, растворимость в биологических средах и способность к пенетрации через

биологические мембраны, от которых зависит цитотоксичность наночастиц, реакция на отложение в легких, распределение внутри фагоцитоспособных клеток, интенсивность токсического действия, включая генотоксичность;

Показано, что наночастицы обладают более высокой токсичностью как на клеточном, так и на органно-системном уровне по сравнению с микрочастицами соответствующего химического состава, в пределах же нанометрового диапазона зависимость органно-системной токсичности от размера частиц является неоднозначной И обуславливается взаимно переплетенными И часто собственно противоположно направленными соотношениями между биологической агрессивностью конкретных наночастиц, с одной стороны, и сложными механизмами, управляющими их токсикокинетикой, с другой.

Впервые дана характеристика реакции альвеолярного фагоцитоза с помощью оптической, электронной, полуконтактной атомно-силовой биохимического исследования микроскопии, на отложение В глубоких путях некоторых металлических и/или металлооксидных дыхательных наночастиц и доказана ее высокая защитная активность. Впервые доказано, что изменение топографии поверхности альвеолярных макрофагов (образование «вдавлений») отражает стадию инвагинации клеточной мембраны как первую фазу фагоцитоза микро- и наночастиц и может служить информативным показателем активности этого защитного механизма.

Построена и идентифицирована многокамерная математическая модель кинетики наночастиц в легких с учетом механизмов альвеолярного фагоцитоза, пенетрации и растворимости, позволяющая делать математический прогноз задержки металлических наночастиц в легких при хронической ингаляционной экспозиции;

Доказана возможность повышения устойчивости организма к вредному действию металлсодержащих наночастиц путем применения комплекса биопротекторов, подобранных с учетом как специфики действия конкретного металла, так и общих токсикокинетических и токсикодинамических механизмов вредного действия таких наночастиц.

Теоретическая и практическая значимость

Углублены и развиты теоретические представления в гигиенической науке, отражающие общие и частные особенности и механизмы токсического действия наночастиц, разработана система критериев токсиколого-гигиенических оценок, воздействии методология гигиенического анализа риска здоровью при металлсодержащих частиц нано- диапазона в условиях производственной среды. Особенности этого токсического действия, должны учитываться при уточненной оценке риска для здоровья рабочих металлургических производств. Обосновано использование в качестве ускоренного скринингового метода сравнительной действия in оценки токсического наночастиц vivo ПО количественной характеристике реакции глубоких дыхательных путей на отложение частиц по цитологическим и биохимическим показателям жидкости, получаемой при бронхо-альвеолярном лаваже. Обоснована среднесменная предельно допустимая концентрация наночастиц диЖелезо триоксида 0,4 мг/м³, нахождением так пороговой (то есть близкой К минимально действующей) называемой концентрации наночастиц в хроническом ингаляционном эксперименте.

Обосновано апробировано И В токсикологических экспериментах применение ряда биопротекторов, повышающих устойчивость организма к общетоксическому и/или генотоксическому действию наночастиц серебра, оксидов меди и никеля. Результаты диссертационной работы послужили для разработки гигиенических рекомендаций по основанием снижению негативных последствий для здоровья работников, а также комплекса средств, повышающих устойчивость организма к комбинированному токсическому действию наночастиц оксидов меди, цинка и свинца.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Доказана принципиальная возможность установления безопасных уровней воздействия металлсодержащих наночастиц на организм по результатам проведенных токсиколого-гигиенических исследований; 2. Разработана методология обоснования этих уровней на основании экспериментальной оценки и анализа зависимости цитотоксических, токсических и генотоксических эффектов металлических и металлооксидных наночастиц *in vivo* от их физико-химических характеристик;

3. Гигиеническая регламентация наночастиц на данном этапе может проводиться без подразделения по суб-фракциям нанодиапазона в связи с неоднозначностью зависимости токсичности от размера наночастиц;

4. Многокамерная модель, учитывающая как физиологические, так и физико-химические механизмы токсикокинетики наночастиц, дает адекватное математическое описание задержки металлических наночастиц в легких при хронической ингаляционной экспозиции;

5. Повышение резистентности организма к токсичности металлсодержащих наночастиц на фоне приема комплекса биопротекторов, подобранных с учетом общих токсикокинетических и токсикодинамических механизмов действия металлсодержащих наночастиц является одним из эффективных методов управления риском здоровью.

Внедрение результатов исследования

- Внесена в ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 13.02.2018 предельно допустимая концентрация наночастиц диЖелезо триоксида (железо(III)оксид) 0,4 мг/м³;

- Материалы диссертационного исследования использованы при оформлении результатов интеллектуальной деятельности:

- «Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наносеребра на организм (патент на изобретение Российской Федерации № 2530639);

- «Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наночастиц оксида меди на организм» (патент на изобретение Российской Федерации № 2560682);

- «Способ повышения устойчивости организма к комбинированному токсическому действию наночастиц оксидов меди, цинка и свинца» (патент на изобретение Российской Федерации № 2642674);

- «Схема многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной области» (патент на промышленный образец №100783);

- Схема «Структура многокамерной модели кинетики распределения и задержки в организме металлсодержащих наночастиц, отложившихся в глубоких дыхательных путях» (патент на промышленный образец №105244);

- на основе разработанных комплексов биопротекторов в стационаре ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора проводятся курсы биопрофилактики рабочим, занятым в пирометаллургическом переделе производства черновой меди (акт внедрения от 20 декабря 2018 г.);

 Результаты исследований используются в практической деятельности учреждений Роспотребнадзора в Свердловской области в системе социальногигиенического мониторинга;

- Материалы диссертационной работы используются при подготовке учебно-методических документов по дисциплинам «Социально-гигиенический мониторинг», «Управление рисками для здоровья населения» учебного плана студентов медико-профилактического факультета на кафедре ПОДГОТОВКИ социальной гигиены, организации санитарно-эпидемиологической службы и ФГБОУ BO «Уральский государственный эпидемиологии медицинский университет» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы, научных положений, выводов и рекомендаций определены дизайном исследований, адекватным выбором методологии с использованием современных методов исследования, достаточным объемом единиц информации, соблюдением принципов доказательной медицины. Концептуальное построение работы базируется на глубоких общетеоретических знаниях и анализе практического опыта.

Материалы исследований представлены на 28 конференциях различного уровня:

6 российских конференциях: 11-й Всероссийский съезд гигиенистов и санитарных врачей, 29-30 марта 2012 г., Москва, Россия; 24-я Российская конференция по электронной микроскопии, 29 мая-1 июня 2012 г., Черноголовка, Россия; 4-й Съезд Токсикологов России, 6-8 ноября 2013 г., Москва, Россия; 6-я Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22-24 октября 2014 г., Ставрополь, Россия; Конференция молодых ученых, 8-10 декабря 2015 г., Санкт-Петербург, Россия; Конференция молодых ученых 2018 г., Лужки, Серпухов, Россия;

и 22 международных: Второй международный форум по нанотехнологиям 6-8 октября, 2009 г., Москва, Россия; NSTI-Nanotech 2010 г., 21-24 июня, 2010г., Анахеим, Калифорния, США; 2-я конференция по лазерной абляции и генерации наночастиц при генерации в жидкостях, 22-24 мая 2012 г., Сицилия, Италия; Международная конференция экологической эпидемиологии **«ISEE** 2010 Conference», 28 августа-1 сентября 2010 г., Сеул, Корея; Международная конференция экологической эпидемиологии «ISEE 2011 Conference», 13-16 сентября 2011 г., Барселона, Испания; 9-я Международная конференция по нанонаукам и нанотехнологиям «NN12», 3-6 июля 2012 г., Солоники, Греция; 3-й ежегодный Всемирный конгресс по наномедицине-2012, 1-3 ноября 2012 г., Чанзен. Китай: Всероссийская научно-практическая конференция С международным участием «Канцерогенная опасность в различных отраслях промышленности и объектах окружающей среды», 24-25 октября 2012 г., Екатеринбург, Россия; 4-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Канцерогенная опасность в различных отраслях промышленности и объектах окружающей среды», 24-25 апреля 2013 г., Екатеринбург, Россия; II International school-conference, 15-19 августа 2013 г., озеро Байкал, Листвянка, Иркутская область, Россия; Международная конференция «Окружающая Среда и здоровье населения-2013», 3-6 марта 2013 г., Бостон, США; 3-я Международная конференция «Nanotek & Expo», 2-4 декабря 2013 г., Лас Вегас, США; Международный конгресс «51st Congress of the European Societies of Toxicology Bridging Sciences for Safety» 14-16 сентября 2015 г., Порто, Португалия; Международный семинар по современным нанотехнологиям, 27-29 августа 2015 г., Екатеринбург, Россия; 2-ой международный конгресс по безопасности искусственных наночастиц и нанотехнологий «SENN2015», 12-15 апреля 2015 г., Хельсинки, Финляндия; 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием «Канцерогенная опасность в различных отраслях промышленности и объектах окружающей среды», 4-5 июня 2015 г., Екатеринбург, Россия; Международный конгресс «Nanobiotox-2016», 8-15 мая 2016 г., Ираклион, Крит, Греция; 8-ой международный конгресс по нанотехнологиям, 1-4 июня 2016 г., Бостон, США; 2-я международная рабочая группа «Modern Nanotechnologies», 27-29 августа 2016 г., Екатеринбург, Россия; Международная конференция «Scanning Probe Microscopy – 2018», 26-29 августа 2018 г., Екатеринбург, Россия; Глобальный саммит «Global Summit on Toxicology», 24-25 октября 2018 г., Париж, Франция: Международная конференция «Environmental and Occupational Health Aspects Related to Nano- and Ultrafine Matter», 3-6 июня 2019 г., Луен, Норвегия.

Апробация диссертации проведена на Ученом Совете в Федеральном бюджетном учреждении науки «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 29 апреля 2019 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 50 работ, в том числе 28 – в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 1 глава в монографии.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 317 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 109 отечественных и 194 зарубежных источников.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в планирование, организацию, проведение исследований, анализ и изложение материала по всем разделам работы составляет не менее 85%.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1. Современное состояние проблемы токсичности наночастиц

За последние годы токсикология наночастиц стала объектом многих экспериментальных исследований, в т.ч. посвященных НЧ тех металлов, которые служили объектом исследований в данной работе: серебра, золота, оксидов железа, меди, никеля.

Интересно отметить, что в томе «Вредные вещества в окружающей среде» под общей редакцией Филова В.А. (2005), даже не упоминаются токсические свойства этих металлов в форме наночастиц – лишнее подтверждение того, что эта проблема возникла в самые недавние годы¹.

В данной главе рассматривается только некоторые литературные данные изучающие *in vitro* или *in vivo* зависимость токсического действия наночастиц или их распределения в организме от размера, химического состава, растовримости, а также вводимой дозы.

В обстоятельных обзорных статьях, посвященных физическим свойствам, биораспределению, медицинскому применению и токсичности нанозолота в зависимости от размера частиц и функционализации поверхности, авторы (Хлебцов Н.Г. и Дыкман Л.А., 2011; Dykman L.A. and Khlebtsov N.G., 2012) приходят к заключению, что многочисленные эксперименты на клеточных культурах не выявили заметной токсичности коллоидных частиц в диапазоне размеров 3-100 нм при дозировках не выше порядка 10¹² частиц/мл. Mustafa T. et

¹ В авторитетной базе данных Американского агентства по охране окружающей среды IRIS (Integrated Risk Information System) характеристика серебра дается в пересмотре 1996 года без упоминания о наносеребре, а характеристики золота вообще нет. В сериях монографий BO3 («Environmental Health Criteria (EHC) Monographs») и МАИР («IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans") не рассматриваются ни серебро, ни золото в какой бы то ни было форме.

al. (2011) при электронно-микроскопическом изучении захвата частиц НЧ Au мышиными остеокластами линии MC3T3-E1 нашли, что в использованных концентрациях НЧ Au не оказывает цитотоксического действия на эти клетки.

По данным Zhang M. et al. (2010), мышиные макрофаги *in vitro* фагоцитируют частицы нанозолота диаметром 60 нм, которые при этом не оказывают на них цитотоксического действия и не стимулируют релиз провоспалительных цитокинов.

Зайцевой Н.В. с соавт. (2018) при однократной 4-часовой ингаляционной экспозиции мышей к оксиду никеля размерами 17-40 нм в концентрации 1,34 мг/дм³ и 150-1500 нм в концентрации 1,30 мг/дм³ судя по сравнительным морфологическим изменениям ткани легких установлено, что наночастиц никеля вызывают более выраженные проявления пульмонотоксичности, чем его микрометровый аналог.

Этой же группой авторов в 2019 году была дана оценка реакции дыхательных путей на однократное интратрахеальное введение нано- (13-20 нм) и микроразмерных (10-20 мкм) частиц оксида алюминия в концентрации 80 мг/мл. Сделан вывод, что наночастицы, имеющие суммарно большую площадь поверхности, чем микрометровый аналог более цитотоксичны судя по содержанию альвеолярных макрофагов и нейтрофильных лейкоцитов и их отношению, эозинофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (Землянова М.А. с соавт., 2019).

Большинство авторов находят как проявления токсического действия НЧ, так и его дозозависимый или времязависимый характер.

Так, Jo M.R. et al. (2015) оценивали токсичность НЧ Au в клетках кишечника человека при трех концентрациях (4, 8 и 13 мг/мл), и нашли, что НЧ Au не оказывает цитотоксического воздействия на клетки после 24 ч воздействия с точки зрения ингибирования пролиферации клеток, повреждения мембран и окислительного стресса. Однако когда небольшое количество клеток подвергалось воздействию НЧ Au в течение семи дней, колониеобразующая

способность четко декретировалась, предполагая ее потенциальную токсичность после длительного воздействия в высокой концентрации.

Naqvi S. et al. (2010) оценивали действие суперпарамагнитных наночастиц оксида железа среднего диаметра 15-30 нм на культуре мышиных макрофагов (J774). Анализ МТТ показал жизнеспособность клеток >95 % в более низких концентрациях (25-200 мкг/мл) и до трех часов воздействия, тогда как при более высоких концентрациях (300-500 мкг/мл) и длительном (шесть часов) воздействии жизнеспособность снижалась до 55-65 %. Анализ некроза-апоптоза выявил потерю большинства клеток. Анализ количественной оценки генерации внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) показал, что воздействие более высокой концентрации наночастиц приводит к усилению генерации АФК, что приводит к повреждению и гибели клеток. Повреждение клеточной мембраны, индуцированное наночастицами, изученное с помощью лактатдегидрогеназного анализа, показало как концентрационно, так и зависящее от времени повреждение клеток. Pisanic T.R. et al. (2007) было найдено, что воздействие возрастающих концентраций НЧ Fe₂O₃, от 0,15 до 15 мг/мл железа, приводит к дозозависимому снижению жизнеспособности и способности клеток PC12 расширять нейроны в ответ на их предполагаемый биологический сигнал, т. е. фактор роста нервов.

Наблюдаются морфологические внутренних органов изменения экспериментальных животных при введении НЧ железа (Мильто И.В. с соавт., 2008; Васюков Г.Ю., 2011). Наволокин Н.А. с соавторами (2011) через 2 часа после однократного внутримышечного введения НЧ железа мышам (в дозах – 7,4 мг/кг, 11 мг/кг, 14,8 мг/кг) и перорального (в дозе 5 мг/кг) крысам находили достоверное увеличение размеров почек и печени по сравнению с контролем. Изменения внутренних органов при внутримышечном введении НЧ имели дозозависимый характер и проявлялись признаками нарушения кровообращения и дистрофии клеток. Скорокина М.Ю. с соавт. (2010) нашли, что однократное внутрижелудочное введение крысам γ -Fe₂O₃ стимулирует дыхательную функцию профиль крови, геометрический эритоцитов, инициирует изменяет

конформационные перестройки гемоглобина, в кровотоке увеличивается количество циркулирующих гиперхромных форм эритроцитов небольших размеров с повышенной упругостью.

В сообщении об ингаляционной экспозиции к наносеребру (5±2 нм, концентрация 3,3 мг/м³, 4 часа в день на протяжении 10 дней) у мышей при цитологическом и биохимическом исследовании жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) и гистологическом исследовании легких Stebounova L.V. et al. (2011) нашли лишь минимальные проявления воспаления и цитотоксичности. Авторы подчеркивают, что необходимы более долгосрочные эксперименты с более высокими легочными нагрузками. Однако у мышей, умерщвленных сразу же или спустя 3 недели после завершения экспозиции, были существенно повышены по сравнению с показателями контрольной группы общая клеточность БАЛЖ и процент нейтрофильных лейкоцитов в ней. Утверждение авторов, что эти изменения имеют малое биологическое значение («this change was of little biological significance»), представляется совершенно произвольным.

Находят разницу в токсическом действии различных по химической природе частиц. Asharani P.V. et al. (2009) сравнили действие на эмбрионах рыбок данио (zebrafish embrios) наночастиц серебра (5-35 нм), золота (15-35 нм) и платины (3-10 нм) и нашли, что наносеребро наиболее токсично, в то время как нанозолото при тех же условиях экспозиции токсичности не проявляет. По данным Li T. et al. (2010), острая токсичность наносеребра выше острой токсичности нанозолота, судя по 48-часовому летальному эффекту у рачков Daphnia magna (при том, что биметаллические частицы занимают промежуточное положение). Comfort K.K. et al. (2011) в эксперименте на стабильной линии человеческих эпителиальных клеток сравнивали действие 10-нм частиц серебра, золота и оксида железа и нашли, что все они даже в низких дозах нарушают реакцию на сигнал эпидермального фактора роста, причем различия действия носят скорее качественный, чем количественный характер. Более высокую цитотоксичность наномеди по сравнению с наносеребром *in* vitro ДЛЯ

человеческих легочных клеток стабильных линий показали Cronholm P. et al. (2013).

Rudolf R. et al. (2012) нашли, что повреждающее действие на клеточные культуры тимоцитов и фибробластов является умеренным для чистого нанозолота, повышаясь с уменьшением размера частиц, и более выраженным при наличии в золоте примесей серебра и других металлов.

С позиций развития общей токсикологии на данном этапе, НЧ являются особо интересным объектом, поскольку их изучение приближает к ответу на важный вопрос о том, действительно ли материал, крайне малотоксичный при величине частиц в микрометровом диапазоне, может в нано-состоянии стать настолько токсичным, что создает серьезный риск для здоровья при его производстве и использовании. В качестве примера может служить то, что оксиды железа в «обычном» состоянии почти все допущены Объединенным Комитетом экспертов по пищевым добавкам (JECFA) в качестве красителей в составе таких добавок как «практически безвредные» при систематическом суточном поглощении до 0,5 мг/кг. Так, Zhu M.T. et al. (2008), сравнивая действие частиц Fe₂O₃ размером 22 нм и 280 нм, нашли, что при дозе 20 мг/кг (но не 0,8 мг/кг) нагрузка альвеолярного макрофага наночастицами и, с другой стороны, проникновение не фагоцитированных частиц в альвеолярный эпителий выше, чем у субмикронных частиц. Более высокая агрессивность наночастиц по сравнению с микрочастицами меди показана в отношении подострого нефротоксического эффекта у крыс Wistar (Liao M. and Liu H., 2012).

Trickler W.J. et al. (2010) исследовали действие наносеребра с частицами 25, 40 или 80 нм на изолированные эндотелиальные клетки микроваскулатуры крыс и нашли, что при этом генерируется каскад провоспалителных медиаторов, которым, по их мнению, *in vivo* может быть вызвано повышение проницаемости гемато-энцефалического барьера. Эти эффекты тем более выражены, чем мельче наночастицы.

Эти же исследователи изучали действие нанозолота (от 3 нм до 60 нм) на клетки эндотелия мелких сосудов мозга крыс *in vitro* и обнаружили, что

мельчайшие частицы захватываются ими в большем количестве, чем более даже в высоких концентрациях лишь умеренно снижают крупные, но жизнеспособность клеток и не влияют на релиз провоспалительных медиаторов. Сопоставление с приведенной выше аналогичной работой тех же исследователей по наносеребру явно свидетельствует о меньшей токсичности нанозолота. Bakri S.J. et al. (2008) не обнаружили токсического повреждения сетчатки глаза кроликов после введения нанозолота в стекловидное тело. Присущая золоту как металлу В обычном состоянии нетоксичность, или «биосовместимость» (biocompatibility), далеко не безоговорочно могут быть приписаны нанозолоту, особенно при мельчайшем размере частиц.² В подтверждение этого к приведенным выше литературным данным можно добавить работу Pan Y.et al. (2009), показавших что мельчайшие (1,4 нм), но не более крупные (15 нм) наночастицы золота, покрытые трифенилфосфин моносульфонатом, повреждают образование митохондрии реактивных форм И вызывают кислорода (оксидативный стресс) с истощением внутриклеточного антиоксидантного пула. Интересно отметить, что эти эффекты ослабевают при обработке нанозолота (1,4 нм) такими антиоксидантами, как глютатион и N-ацетилцистеин.

Chen Y-Sh. et al. (2009) при повторных внутрибрюшинных инъекциях наночастиц золота диаметром от 8 до 37 нм отмечали выраженные клинические признаки интоксикации, а также задержка частиц в печени, легких, селезенке и гистопатологические изменения в них, в то время как частицы диаметром 5 нм и 3 нм этими вредными эффектами не обладали. В эксперименте на кроликах Glazer E.S. et al. (2010) показали, что частицы нанозолота 25 нм распределяется в организме после однократного внутривенного введения более равномерно, чем 5 нм, но не обнаружили признаков дисфункции каких-либо внутренних органов. Вместе с тем, при однократном внутрипищеводном введении крысам меченного нанозолота с частицами от 1,4 нм до 200 нм Semmler-Behnke M. et al. (2012) не нашли однозначной зависимости накопления метки в разных органах от размера

² Отметим также, что известное со времен алхимиков и подтверждаемое опытом современной медицины лечебное использование коллоидного золота исключает его биологическую инертность

НЧ. То, что наибольшее накопление, в целом, получено при введении мельчайших (1,4 нм) частиц скорее всего свидетельствует об их наибольшем проникновении через кишечные барьеры, однако наибольшая задержка в мозгу и сердце наблюдалась при введении частиц 18 нм.

В эксперименте на мышах Park E-J.et al. (2010) нашли, что после повторных пероральных введений наночастиц серебра диаметром 22, 42 или 71 нм они обнаруживаются в мозгу, легких, печени, почках и яичках, в то время как после введения частиц диаметром 323 нм обнаружить их во внутренних органах не удается. Гистопатологические изменения в печени и почках, а также дозозависимые сдвиги содержания цитокинов в крови обнаружены после введения наносеребра 42 нм на протяжении 28 дней. Субхроническая (90 дней) пероральная токсичность разных доз наносеребра со средним диаметром частиц 56±1,46 нм была изучена также на беспатогенных крысах F344 (Kim S. et al., 2010). Наиболее существенные изменения были связаны с действием наночастиц серебра на печень, хотя накопление его обнаружено во всех внутренних органах. Пороговая доза (LOAEL) найдена равной 125 мг/кг, максимальная недействующая (NOAEL) – 30 мг/кг.

Предметом дискуссии остается вопрос о том, определяется ли токсичность действием перешедшими наночастиц как таковых или В раствор соответствующими ионами. На модели бактерицидного действия наночастиц серебра, фиксированных на нано-структурированных частицах диоксида кремния, Sotiriou G.A. and Pratsinis S.E. (2010) нашли, что при диаметре менее 10 нм действие определяется, в основном, концентрацией переходящих в раствор ионов серебра, в то время как более крупные наночастицы этого металла действуют как таковые, и их бактерицидность сопоставима с бактерицидностью Ад-ионов. Напротив, Kim J.et al. (2011) в тестах на Daphnia magna и Oryzias latipes не обнаружили острой токсичности суспензий наносеребра 60 нм и 300 нм, не содержащих ионов серебра.

Beer C. et al. (2012) в экспериментах на стабильной линии легочных клеток А549 нашли, что если растворенная фракция составляет не менее 5,5 % всего

серебра в суспензии, то вклад самих наночастиц в ее токсичность неопределимо мал, в то время как при малой доле растворенной фракции (≤2,6 %) суспензия токсичнее, чем ее супернатант. Таким образом, во втором случае проявляется не только действие Ag-ионов, но и собственно токсичность наночастиц. Отметим, что возможность образования столь высоких концентраций Ag-ионов при растворении наносеребра в организме сомнительна.

Рагк М.V. et al. (2011) нашли, что частицы наносеребра 20 нм, которые по всем изученным авторами эффектам более токсичны *in vitro*, чем частицы наносеребра 80 нм и 113 нм, токсичнее и по сравнению с ионами серебра. С другой стороны, судя по данным, полученным Srivastava M. et al. (2011) на линиях кератоцитов HatCat и легочных клеток А549, подавление селенового метаболизма вызывается Ag-ионами при значительно менее высоких концентрациях, чем частицами наносеребра.

Limbach L.K. et al. (2010) недвусмысленно озаглавили свою статью «Цитотоксичность наночастиц зависит от внутриклеточной растворимости». Эти авторы сравнивали потерю жизнеспособности клетками стабильных линий (человеческой HeLa и ооцитов китайского хомячка) при воздействии наночастиц меди, покрытых слоем углерода и потому практически нерастворимых, и активно растворяющихся в модельных жидкостях наночастиц CuO и нашли, что при равных дозах вторые гораздо цитотоксичнее. Ионная форма меди действовала практически так же, как наночастицы CuO.

Вопdarenko O. et al. (2012), сопоставляя действие нано- и микрочастиц CuO на кишечную палочку с их растворимостью и с действием CuSO₄, пришли к выводу, что ключевым звеном действия наночастиц на аналогичные показатели является именно их растворение. Pang C. et al. (2013) не нашли количественных различий в действии CuCl₂, нано- (6 нм и 100 нм) и микрочастиц (< 5 мкм) CuO на улиток, кормящихся илом (Potamopygus antipodarum) при заданной концентрации меди, что косвенно свидетельствует в пользу ключевой роли Cu-иона.

Cuillel M. et al. (2014) в экспериментах на гепатоцитах линии HepG2 сравнили влияние субтоксичных доз HЧ CuO и CuCl₂, эквивалентных по меди, на

экспрессию ряда генов, кодирующих белки, которые участвуют во внутриклеточном гомеостазе меди и цинка, и на прямые показатели этого гомеостаза. Полученные результаты свидетельствуют, по мнению авторов, о том, что НЧ СиО действуют подобно Троянскому коню: проникают внутрь печеночной клетки (вероятнее всего, путем эндоцитоза), обходя клеточные механизмы защиты от избыточной меди, но последующее растворение этих НЧ внутри эндосомы ведет к повышению концентрации Си внутри гепатоцита (Cuillel M. et al., 2014).

Несмотря на способность к растворению, наночастицы накапливаются во внутренних органах. Balasurbamanian S.K. et al. (2010) нашли, что у крыс нанозолото после однократного внутривенного введения вскоре стойко накапливается в печени и селезенке, а через месяц обнаруживается также в почках и тестикулах. Задержка в легких была относительно кратковременной, а в головном мозгу золото обнаружено не было. В клетках печени и селезенки показано изменение экспрессии ряда генов. У кроликов с имплантированной опухолью печени через 24 часа после однократного внутривенного введения нанозолота с частицами 5 нм или 25 нм этот металл обнаруживался только в печени, селезенке и опухолевых клетках, но не было обнаружено никаких признаков токсического действия на какие-либо органы, хотя действие частиц 25 нм вызвало значимый лейкоцитоз (Glazer E.S. et al., 2011). По данным Ahmadi F.and Kordestany А.Н. (2011), у бройлерных цыплят, получавших в течение 3-6 недель корм с добавлением наносеребра накопление серебра в скелетных мышцах было более высоким, чем во внутренних органах, из которых наибольшим оно было в селезенке.

Особого рассмотрения заслуживают данные о генотоксичности наночастиц – свойства, которое неблагоприятно для организма и само по себе, и как предиктор вероятной канцерогенности наноматериалов. Теоретическими предпосылками к прогнозированию этого свойства уже на первых этапах развития нанотоксикологии были: - ожидаемая способность наночастиц к проникновению не только внутрь самых различных клеток, но и далее - внутрь клеточного ядра;

- их огромная удельная поверхность, обеспечивающая высокую вероятность взаимодействия активных центров этой поверхности с био-макромолекулами (в частности, с ДНК);

- повышенная физическая и химическая активность этих центров, связанная с изменениями молекулярной структуры поверхности при высоком радиусе ее кривизны, а отсюда – не только усиление указанного взаимодействия, но и особая способность к запуску свободно-радикальных процессов (в частности, к образованию активных кислородных радикалов, повреждающих ДНК).

Олнако исследователи получают позитивный результат, не все В особенности, при тестировании генотоксичности наноматериалов не на клеточных культурах. Например, Kim H.R. et al. (2013) исследовали генотоксические эффекты 40-59 нм наночастиц серебра в тесте Эймса, используя Салмонеллы typhimurium TA98, TA100, TA1535 и TA1537 штаммов показало, что наносеребро не проявляет мутагенное действие, что может быть связано с неспособностью бактерий к эндоцитозу.

Не всегда находят генотоксические эффекы и при оценке *in vivo*. Так, Kim Y.S. et al. (2008) утверждают отсутствие генотоксичности при пероральной даче крысам в течение 28 дней 60-нанометрового серебра в дозах 30, 300 или 1000 мг/кг на основании того, что не обнаружили увеличения числа микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга и процента последних по отношению ко всему эритроцитарному пулу.

Другие исследователи даже на низких дозах находят генотоксическое действие наночастиц. Wen L. et al. (2017) обнаружили, что внутривенное введение наночастиц серебра в дозе 0,5 мг/кг массы тела SPF крысам самкам Sprague-Dawley приводит к повреждениям хромосом, которые главным образом выражены в их обрывах.

Генотоксческий эффект НЧ серебра был найден Tiwari D.K. et al. 2011 в тесте Comet assay при введении крысам Wistar внутривенно однократно в дозах 4,

10, 20 и 40 мг/кг, в группах, которым водили 40 и 20 мг/кг наблюдались статистически значимые отличия показателей от контрольных. Tavares et al. (2012), с помощью того же теста исследовали генотоксичность наносеребра 5-45 нм в разных концентрациях и при разных длительностях экспозиции и получили положительный результат на клетках человеческой крови, но ни при каких условиях воздействия – на мышах линии Swiss. Эти авторы, полагают, что повреждение ДНК при действии НЧ Ag, которое они нашли в своих экспериментах *in vitro*, связано, в основном, с образованием реактивных форм кислорода, и объясняют отсутствие этого повреждения *in vivo* активацией антиоксидантной системы.

Kang S.J. et al. (2012) на культуре клеток рака яичника нашли, что HЧ Ag повышает Nrf2-зависимую экспрессию гемоксигеназы-1 и приписывают ей защитную роль по отношению повреждению ДНК, а затем и гибели клеток под влиянием этих HЧ.

Sonmez El. et al. (2016) исследовали генотоксичность НЧ магнетита различных концентраций (100, 150, 300, 500 и 1000 мг/л) в культуре лимфоцитов человека. После инкубирования образцов крови с добавлением магнетита, в течение 72 ч. было найдено увеличение обмена сестринских хромосом, микроядер, хромосомных аббераций и уровня 8-OH-dG.

Dumala N. et al. (2017) оценивали генотоксичность НЧ NiO размером 15,62±2,59 нм при однократном пероральном введении в трех дозах 125, 250 и 500 мг/кг крысам самкам Wistar, получили, что в тесте Comet assay НЧ NiO вызывают высокозначимое (P < 0,001) повреждение ДНК в дозе 500 мг/кг в лимфоцитах переферической крови, клетках печени и почек крыс через 24 часа. Результаты микроядерного теста и исследований хромосомных аббераций согласуются с данными анализа комет.

Положительный результат при оценке в тесте Comet assay генотоксического действия НЧ Fe₂O₃ был найден при взаимодействии Fe₂O₃ 50 нм в концентрациях 2, 5,10 и 50 мкг/мл с культурами человеческих легочных фибробластов (IMR 90) и клетками эпителия легких (BEAS-2B). Исследователи нашли, что через 24 часа

при воздействии концентраций 10 мкг/мл были зарегистрированы нарушение в ДНК клетках эпителия легких, при концентрации 50 мкг/мл в обоих типах изучаемых клеточных культур (Bhattacharya K. et al., 2009).

Pan X. et al. (2010) в тесте Эймса нашли, что НЧ СиО обладают мутагенностью, которую в тех же условиях не проявляют наночастицы Al₂O₃, Co_3O_4 , TiO₂ и ZnO. Gomes T. et al. (2013) обнаружили повреждение ДНК в клетках гемолимфы ракушек Mytilus galloprobincialis при действии НЧ CuO и Ag, но ионы действовали еще сильнее ЭТИХ металлов (как полагают авторы. при различающихся механизмах генотоксичности). Alarifi S. et al. (2013) показали, что НЧ CuO обладают цитотоксическим и генотоксическим действием на кератоциты кожи человека in vitro, вероятно, опосредованным через оксидативный стресс. Akhtar M.J. et al. (2013), использовавшие эпителиальные легочные клетки человека линии A549, также продемонстрировали, что частицы CuO диаметром 24 нм обладают дозо-зависимой цитотоксичнотстью и генотоксичностью, оцененной с помощью теста на образование комет и по образованию микроядер, причем оба теста тесно коррелировали с образованием реактивных форм кислорода.

Вместе с тем, авторы обзора литературных данных по генотоксичности и канцерогенности кобальт-, никель- и медьсодержащих наночастиц Magaye R. et al. (2012) подчеркивают, что для них имеется крайне недостаточно исследований *in vivo*.

Несмотря на все увеличивающиеся экспериментальные данные о генотоксичности наночастиц, подробные механизмы этого действия изучены недостаточно.

О важной роли оксидативного стресса, спровоцированного действием НЧ, в механизмах повреждения ими ДНК говорят данные Kim J.S. et al. (2011), полученные на линии клеток человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B после воздействия НЧ Ag (43-260 нм). В частности, они не только показали, что наносеребро значительно увеличивает образование кислородных радикалов, но и

обнаружили существенное блокирование генотоксических эффектов НЧ Ag в присутствии супероксиддисмутазы.

Активацию антиоксидантной системы Arora S. et al. (2009) показали при воздействии наносеребра на мышиных клетках *in vitro*. Есть исследования, показывающие, что НЧ Ад могут взаимодействовать с ДНК и напрямую, например, нарушая водородную связь между двойной нитью ДНК и влияя на изменение ее конформации (Rahban M. et al., 2010).

Kang S.J. et al. (2012) на культуре клеток рака яичника нашли, что наносеребро повышает Nrf2-зависимую экспрессию гемоксигеназы-1 и приписывают ей защитную роль по отношению повреждению ДНК, а затем и гибели клеток под влиянием НЧ Аg.

Вместе с тем, в эксперименте на рыбках данио Choi J.E. et al. (2010) продемонстрировали, наряду с признаками оксидативного стресса, также повреждение ДНК в печеночной ткани, судя по γ-H2AX (маркеру разрыва двойной спирали) и экспрессии белка p53.

Foldbjerg R. et al. (2011) в экспериментах на линии А549 (клетки рака легких человека) также показали, что вызываемое действием НЧ Ад образование аддуктов ДНК, как и цитотоксические эффекты наносеребра, сильно коррелируют с образованием реактивных форм кислорода, а предварительная подготовка подавить наносеребра. клеток антиоксидантами может генотоксичность Аналогичное подавление как цитотоксичности, так и генотоксичности НЧ Ад «подбиральщиками» (scavengers) радикалов O₂- и H₂O₂, соответственно, тироном (4,5-диокси-1,3-бензолдисульфоновая кислота) И диметилтиомочевиной продемонстрировали также Panda K.K. et al. (2011), но на растительных клетках.

Напротив, функционализация поверхности частиц НЧ Ag полисахаридным покрытием повышает их генотоксичность, что авторы (Ahamed M. et al., 2008) объясняют склонностью не покрытых частиц к агломерации, а тем самым – к уменьшению поверхности, контактирующей с органеллами клетки, чему и препятствует полисахаридное покрытие.

Среди процессов, происходящих в клеточном ядре при действии НЧ, в частности серебра, обращается внимание на образование двунитевых разрывов ДНК и хромосомных аберраций, что сопровождается активацией систем репарации ДНК с участием ДНК-зависимых протеинокиназ и задержкой клеточного цикла на стадии S/G2 или индукцией апоптоза (Asharani P.V.et al., 2009).

Недостаточность и противоречивость данных, как об общей токсичности, так и о генотоксичности вещества, приобретающего в нано-состоянии ряд особых свойств, играющих важную роль в сложных механизмах повреждающего, в том числе генотоксического действия делают особо актуальными исследования этих эффектов *in vivo* в связи с тем, что ответ организма и эффективность защитных механизмов, в частности активности антиоксидантной системы, могут быть исследованы только в экспериментах на целостном организме лабораторных животных.

1.2. Теоретическое обоснование выбора биопротекторов

Идея повышения естественной резистентности организма к токсичности и генотоксичности металлсодержащих НЧ основывалась на накопленном свыше 30 лет опыте разработки и успешной апробации способов повышения резистентности организма к большому числу других токсикантов.

За эти годы в ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора в отделе токсикологии и биопрофилактики под руководством заслуженного деятеля науки РФ проф. Б.А. Кацнельсона и в лаборатории научных основ биопрофилактики под руководством проф. Л.И. Приваловой, накоплен большой материал, позволивший развить теоретические основы и общую методологию этого направления, получившего название «биологическая профилактика». Теория и обобщенная практика биологической профилактики профессиональных и экологически обусловленных заболеваний химической и пылевой этиологии освещены в обзорных статьях, которые неоднократно публиковались как в отечественных, так и в международных журналах (например, Кацнельсон Б.А. с соавт. 1999; Дегтярева Т.Д., 2002; Кацнельсон Б.А. с соавт., 2004; Киреева Е.П., 2007; Привалова Л.И. с соавт., 2008). Краткая схема биологической профилактики показана на Рисунке 1.1, впервые она была представлена в монографии Кацнельсона Б.А. с соавт. (1999).

Для повышения устойчивости организма (или снижения его чувствительности) к воздействию промышленных ядов, могут использоваться:

а) биопротекторы, первично нацеленные на повышение эффективности естественных механизмов биотрансформации и элиминации ядов и, таким образом, на снижение внутренней дозы вредного вещества в организме, в особенности, в органах-мишенях (на схеме Рисунка 1.1 обозначено как «токсикокинетические эффекты»);

б) биопротекторы, нацеленные на поддержание функциональных резервов на всех уровнях организма, поражаемых токсическим веществом, а также на повышение эффективности репаративно-компенсаторных процессов и на использование физиологических и токсикологических антагонизмов (на схеме обобщено как «токсикодинамические эффекты»).



Рисунок 1.1 – Точки приложения и эффекты действия противотоксических биопротекторов (Кацнельсон Б.А. с соавт., 1999).

Эти два типа противотоксической биопротекции обычно взаимосвязаны и взаимообусловлены, как это изображено реципрокными связями-стрелками между соответствующими блоками рассматриваемой схемы. Действительно, снижая задержку токсического вещества в организме и, особенно, в органемишени, биопротектор тормозит развитие патологического процесса (и, таким образом, первично токсикокинетическое действие дает благоприятный токсикодинамический эффект). С другой стороны, первичное повышение устойчивости к повреждающему действию яда на те клетки и органы, которыми контролируются процессы элиминации или детоксикации (легочные макрофаги, печень, почки), поддерживает эффективность этих процессов и тем самым снижает задержку яда в организм (таким образом, мы имеем дело с благоприятным токсикокинетическим эффектом токсикодинамического биопротектора).

Такая двусторонняя взаимозависимость токсикокинетических и токсикодинамических эффектов в разной степени выражена в реакциях на разные вредные вещества, но в целом может рассматриваться как постоянная черта биопротекторного действия.

Вместе с тем, блок-схема на Рисунке 1.1 отражает то, что как токсикокинетические, так и токсикодинамические биопротекторы могут быть:

- относительно специфичными в отношении конкретного яда или конкретной группы ядов, если биопротекторное действие вмешивается в механизмы токсикокинетики и токсикодинамики, характерные именно для этих ядов;

- преимущественно неспецифичными, если оно реализуется через такие обобщенные реакции организменного уровня как общий адаптационный синдром по Селье или родственная, но все же отличная от него концепция СНПС («состояние не специфически повышенной сопротивляемости»), развивавшаяся школой выдающегося отечественного токсиколога и фармаколога Лазарева Н.В.

Важно, что один и тот же биопротектор может в различных ситуациях или действовать, в значительной степени, как специфический, или же помогать организму, главным образом, как агент, усиливающий неспецифические механизмы защиты и таким путем повышая устойчивость к разнообразным вредным экспозициям, что также показано схемой.

Биопротекторы с не полностью совпадающими механизмами действия оказываются, как было показано нашими экспериментами, наиболее эффективными, если применяются не обособленно, а в составе комбинаций, которые мы называем «биопрофилактическими комплексами» (БПК).

Положительные результаты биопрофилактики были получены на

экспериментальных моделях различных пневмокониозов (силикоз, асбестоз, монацитовый пневмокониоз) и субхронических интоксикаций свинцом, хромом, мышьяком, фтором, марганцем, ванадием, кадмием, фенолом, нафталином, формальдегидом, бенз(а)пиреном в различных комбинациях, при использовании качестве биопротекторов пектина, глутамата, адаптогена растительного В происхождения и добавок, содержащих кальций, йод, железо, медь, витамины и некоторые аминокислоты, причем наиболее эффективно использование этих средств в различных комплексах, составленных с учетом свойств действующих токсикантов. Если последние обладают также мутагенным (генотоксическим) эффективный антитоксический БПК действием, чаще всего снижает И (тем Этот мутагенность самым, вероятно, И канцерогенность). антигенотоксический эффект БПК усиливается при его сочетании с препаратами, богатыми неэстерифицированными жирными кислотами класса омега-3.

Имея в виду возможность последующего их применения людьми, в состав таких БПК включены только те вещества, которые сами по себе безвредны при длительном назначении в профилактически эффективной дозировке, уделяя особое внимание дополнительной проверке этой безвредности.

Экспериментально апробированные БПК проверяются на эффективность и безвредность в условиях контролируемого испытания на ограниченных группах лиц, находящихся под соответствующей вредной экспозицией, и, после получения положительных результатов, используются для массовой защиты субпопуляций, проживающих в различных промышленно загрязненных городах или работающих под воздействием вышеперечисленных вредных экспозиций.

Другими исследователями возможность подавления токсичности некоторых металлсодержащих наночастиц если и демонстрировалась, то, как правило, в экспериментах *in vitro* и использовалась скорее, как свидетельство важности механизмов антиоксидантной защиты, чем как предпосылка к развитию целостной биопрофилактической системы (Sokol R.J. et al., 1989).

Между тем, именно создание такой системы всегда служило основной целью подхода, базирующегося на понимании как общих и частных механизмов

токсичности, так и рассмотренных выше общих принципов подбора биопротекторов.

Резюме

Суммируя информацию, содержащуюся в вышеприведенных публикациях, продемонстрирована можно сказать, что ИМИ выраженная токсичность наночастиц и показано, что среди первичных механизмов действия на клетку существенную роль играет генерация свободных кислородных радикалов. Однако большинстве исследований в подавляющем этих цитотоксичность И генотоксичность наночастиц оценивались на культурах стабильных клеточных линий и мало – на животных *in vivo*.

Количественных и даже описательных данных для обоснования достоверной оценки рисков для здоровья, связанных с профессиональным и экологическим воздействием наночастиц все еще недостаточно. К тому же, исследования, проведенные в разных лабораториях разными методами на разных экспериментальных моделях с оценкой токсического действия по не часто совпадающим показателям, трудно сопоставимы и обобщаемы. Такая критическая оценка ситуации наиболее справедлива и в отношении изучения хронической токсичности.

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведено 19 серий острых, субхронических и хронических опытов (Таблица 2.1) более чем на 1000 аутбредных крысах-самках собственного разведения при начальной массе тела 150-220 г. в возрасте 3-4 месяцев. Для изучения токсических эффектов, животные делились на группы, не менее 10 особей в каждой, при этом каждое животное получало групповую и индивидуальную метки, характеризующие принадлежность к группе и индивидуальный номер в эксперименте.

Оценка токсичности изучаемых НЧ проводили на трех экспериментальных моделях:

- реакции глубоких дыхательных путей на отложение в них НЧ по цитологическим и биохимическим характеристикам жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже через 24 часа после однократной интратрахеальной инстялляции водной суспензии наночастиц;

- субхронической интоксикации, развивающейся в результате повторных интраперитонеальных инъекций такой суспензии;

- хронической интоксикации при ингаляционной экспозиции продолжительностью до 10 месяцев.

№ п/п	Серии экспериментов	Число крыс	Количество исследований	
Оценка реакции альвеолярного фагоцитоза				
при инп	пратрахеальном введении:			
1	частиц магнетита (Fe ₃ O ₄) трех размеров -10 нм, 50 нм и 1 мкм	52	208	

Таблица 2.1 – Перечень серий экспериментов
№ п/п	Серии экспериментов	Число	Количество		
		крыс	исследований		
2	медьсодержащих частиц 340 нм и 20 нм	39	468		
3	наночастиц серебра, золота и микрочастиц серебра	82	574		
4	наночастиц оксидов никеля двух размеров (11 нм и 25нм)	39	390		
5	наночастиц оксидов никеля и железа	39	390		
при инг	аляционной экспозиции:				
6	к наночастицам оксида железа в течении 3, 6 и 10 месяцев	60	720		
7	к наночастицам оксида никеля через 24 часа, 1 и 3 недели после окончания 5-кратного поступления	60	600		
8	к наночастицам оксида никеля в течении 3, 6 и 10 месяцев	60	720		
(Сравнительная оценка токсического действия в субхрони	ических э	кспериментах		
при вну	трибрюшинном введении:				
9	частиц магнетита трех размеров – 10 нм, 50 нм и 1 мкм	80	4000		
10	наночастиц серебра и золота	60	3000		
11	наночастиц оксидов никеля двух размеров (11 нм и 25 нм)		2250		
12	медьсодержащих частиц 340 нм и 20 нм	24	120		
при ингаляционном поступлении:					
13	оксида железа через 3, 6 и 10 месяцев	60	5700		
14	оксида никеля после 5-кратной экспозиции	60	1800		
15	оксида никеля через 3, 6 и 10 месяцев	60	5700		
Оценка эффективности комплексов биопротекторов разнонаправленного действия, снижающих:					
16	токсическое и генотоксическое действие наночастиц серебра в субхроническом эксперименте	52	2800		
17	генотоксическое действие наночастиц меди в субхроническом эксперименте	52	208		
18	генотоксическое действие наночастиц никеля в 3 месячном ингаляционном эксперименте	40	80		

№ п/п	Серии экспериментов		Количество
		крыс	исследований
19	цитотоксическое действие наночастиц никеля при	40	200
	интратрахеальном введении		

Животные содержались в условиях специально организованного отделения вивария, соответствующих санитарно-эпидемиологическим и ветеринарным требованиям. В качестве питья использовали воду питьевую артезианскую «Ключи», дочищенную до первой категории качества (Сертификат соответствия № РОСС RU. АЯ 55. В 17460). Крысы принимали полнорационный комбикорм ООО «Лабораторкорм», который сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам (Сертификат соответствия № РОСС RU. ПР98. B01220 08.02.2010 содержались ЛО г.). Животные В условиях соответствующих СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических (вивариев)», «Правилам клиник проведения работ c использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977г. №755) и «International guiding principles for biomedical research involving animals», разработанными the Council for International Organizations of Medical Sciences (1985).

2.1. Характеристика частиц, используемых в экспериментах

Интратрахеальные инстялляции и внутрибрюшинные введения проводились с водными суспензиями частиц оксида железа Fe_3O_4 (магнетита), имевшими средний диаметр 10 нм, 50 нм или 1 мкм, золота (4 нм или 50 нм), серебра (4 нм или 49 нм и 1,1 мкм), оксида меди (20 нм или 340 нм), оксида никеля NiO (25 нм или 11 нм).

Учитывая теоретические и практические задачи исследований, в них использовались не коммерческие нанопорошки, а целенаправленно изготовленные и тщательно охарактеризованные наночастицы и микрочастицы чистых металлов или их оксидов. При этом только наночастицы и микрочастицы магнетита были синтезированы химически, а в остальных случаях использовалась методика, специально разработанная в Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВО «УрФУ им.первого Президента России Б.Н. Ельцина», которая основана на лазерной абляции пластин соответствующего металла 99,99 % чистоты в деионизированной воде (Рисунок 2.1.1).

Основные преимущества этой методики состоят в том, что она позволяет получить нано-суспензии с В достаточно частицами узком диапазоне распределения по высокостабильные нано-суспензии, размерам И дает характеристики которых сохраняются неизменными, как правило, в течение времени, достаточного проведения описываемых периода ДЛЯ ниже токсикологических экспериментов. При этом ни в одном случае не были какие-либо химические стабилизаторы, использованы которые неизбежно бы характеристику исказили токсикологическую частиц, И только В подвергать экспериментах С магнетитом приходилось суспензии ультраозвучиванию непосредственно перед их введением в организм.



Рисунок 2.1.1 – Схема метода получения водной суспензии МеО-НЧ: 1 – лазер, 2 – фокусирующая линза, 3 – металлическая мишень, 4 – кювета с деионизированной водой.

Форма и размер частиц были охарактеризованы с использованием сканирующей электронной микроскопии, а химическая идентичность – с помощью конфокальной микроскопии комбинационного рассеяния. В нескольких экспериментах исследована кинетика растворимости металлических НЧ модельных биологических средах. Стабильность суспензий характеризовалась величиной дзета-потенциала, измеренного с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), и была высокой (дзета-потенциал вплоть до 42 mV), что позволило повысить концентрацию суспензии путем частичного испарения воды при 50°С. Этим способом удалось достичь концентрации 0,5 мг/л без изменения размера и химической идентичности металлических НЧ.

Распределение частиц по размерам, как видно из графиков, приведенных на Рисунках 2.1.2-2.1.4, было симметричным и укладывалось в нанодиапазон. На тех же графиках указаны средние размеры. Хотя единичные металлические НЧ всегда имеют тенденцию к слипанию, однако образующиеся агрегаты были, как видно из изображений, полученных сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), неплотными и, в основном, тоже наноразмерными (Рисунки 2.1.4 и 2.1.5).



Рисунок 2.1.2 – Функции распределения размеров: (а) наночастиц золота и (б) наночастиц серебра, полученных при СЭМ



Рисунок 2.1.3 – Функции распределения размеров наночастиц NiO по размерам, полученных при СЭМ



Рисунок 2.1.4 – (а) СЭМ изображения медьсодержащих НЧ, (б) функция распределения размеров частиц, полученных при СЭМ.



Рисунок 2.1.5 – (а) Наночастицы золота и (б) серебра со средним диаметром, ответственно, 50±10 нм и 49±5 нм. СЭМ при увеличении x150 000

Суспензия микрочастиц серебра со средним диаметром 1,1 мкм была получена путем сжигания беззольных фильтров, пропитанных нитратом серебра, с последующим ультразвуковым диспергированием в деионизованной воде.

Микрочастицы меди получали отмучиванием при ультразвуковом воздействии вводной взвеси порошка, образовавшегося при электрическом взрыве медной проволоки той же чистоты (Рисунок 2.1.6).



Рисунок 2.1.6 – (а) СЭМ изображения медьсодержащих МЧ, (б) функция распределения размеров частиц, полученных при СЭМ

Для получения наночастиц магнетита с заданными размерами использован синтез в наноразмерных «реакторах» - мицеллах (Gubin S.P. et al., 2005). Строгое дозирование солей железа позволяет варьировать размер наночастиц и получать наночастицы с достаточно узким распределением по размерам.

Синтез осуществляли по реакции:

 $FeCl_2 + 2FeCl_3 + 8NH_4OH \rightarrow Fe(OH)_2 * 2Fe(OH)_3 + 8NH_4Cl$

Размер и фазовый состав НЧ контролировали методом электронной микроскопии (электронные микроскопы FEI MORGAGNI 286(D) (США) и Philips СМ 300 (Голландия).

Магнитные свойства наночастиц подтверждены методом Весов Фарадея, намагниченность составила 82 emu/g.

Микрочастицы Fe₃O₄ получали 2-минутным механическим измельчением агломератов, образующихся в результате хранения в течение 30 дней НЧ размером 50 нм. Затем с помощью системы сит выделяли фракцию с размерами ~ 1 мкм. Размер микрочастиц подтверждали методом оптической микроскопии. Фазовый состав микрочастиц контролировали методом рентгенофазового анализа

(дифрактометр «Дрон – 2.0», Си Кα – излучение), намагниченность - методом Весов Фарадея.

2.2. Методика экспериментальных исследований

Интратрахеальное введение водных суспензий, проведение бронхоальвеолярного лаважа и микроскопическое изучение полученных с его помощью клеток

Интратрахеальная инстялляция водных суспензий изучаемых частиц либо стерильной деионизированной воды без частиц (контроль) осуществлялось под контролем зрения (с помощью специальной воронки и лобного рефлектора) крысе под эфирным рауш-наркозом и служила экспериментальной моделью для оценки особенностей реакции глубоких дыхательных путей на отложение в них частиц при естественной ингаляции, контрольным крысам вводился 1 мл той же стерильной деионизированной воды (Методические рекомендации, 1995). Адекватность этой модели, широко и давно используемой для изучения действия на легкие различных частиц микрометрового диапазона была хорошо обоснована тем, что наиболее важные качественные и количественные характеристики реакции свободной клеточной популяции глубоких дыхательных путей (в этих характеристик от степени цитотоксичности частности, зависимость отложившихся в них частиц), оцениваемые при ингаляционной экспозиции к ним в принципе те же, что и при их интратрахеальном введении. В Главе 3 будет показано, что сказанное справедливо и для ингаляционного воздействия наноаэрозоля.

Та же самая экспериментальная техника давала при центрифугировании 24 и/т полученной через после инстялляции жидкости, часа при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ), клеточный материал для оптической, (ПЭМ) просвечивающей электронной И полуконтактной атомносиловой микроскопии (пкАСМ) с целью изучения фагоцитарной активности альвеолярных

макрофагов (AM) и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), а также внутриклеточной локализации частиц и вызываемых ими ультраструктурных повреждений клетки. Полученные при этом результаты сопоставимы с литературными данными об исследованиях, проводимых *in vitro*, но являются ценным дополнением к ним, поскольку взаимодействие между частицей и клеткой *in vivo* происходит в том микроокружении, которое не может быть полностью воспроизведено в клеточной культуре.

Оптическая микроскопия

Аликвотная проба промывной жидкости легких набиралась в меланжер для белых кровяных телец вместе с 3 % уксусной кислотой и метиленовым синим. Подсчет клеток велся с помощью камеры Горяева.

Для цитологического исследования БАЛЖ центрифугировали в течение 4 мин. при 200g, затем жидкость декантировалась, а из осадка готовились мазки на два предметных стекла. После просушивания на воздухе мазки фиксировались метиловым спиртом и окрашивались азур-эозином. Мазки микроскопировались с иммерсией при увеличении х1000. Дифференциальный подсчет для определения процента альвеолярных макрофагов (AM), нейтрофильных лейкоцитов (HЛ) и прочих клеток проводился до общего числа подсчитанных клеток, равного 100. С учетом общего числа клеток в БАЛЖ эти проценты пересчитывались на абсолютное число AM и HЛ.

Полуконтактная атомно-силовая микроскопия

Аликвотная проба (3 мкл) сгущенной клеточной взвеси, полученной при центрифугировании БАЛЖ, осаждалась на свежем сколе слюды. Спустя 60 минут избыточная суспензия удалялась с помощью фильтровальной бумаги, и проба высушивалась в струе чистого воздуха или азота в течение 30 сек. Поскольку после высушивания БАЛЖ на слюдяной поверхности образуются микрокристаллы удаления проба промывалась соли, ДЛЯ ИХ дважды деионизированной водой.

Полуконтактная атомно-силовая микроскопия (пк-ACM) осуществлялась с помощью зондовой нано-лаборатории NTEGRA Therma (Россия) с

использованием зондовых датчиков NSG01 высотой 10-15 мкм и радиусом закругления острия 10-15 нм. Для статистической обработки и анализа результатов измерений использовался специализированный программный продукт SPIP (Image Metrology, Дания) and SIAMS Photolab (Россия). Разработанная методика давала возможность идентифицировать вдавления («вдавления») на образе клеточной поверхности и измерить диаметр и глубину каждого вдавления.

Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия

Для изучения с помощью трансмиссионной электронной микроскопии внутриклеточной локализации наночастиц в АМ и НЛ, а также визуализации повреждений ЭТИХ ультраструктурном клеток на уровне полученную вышеописанным способом БАЛЖ переносили в силиконированные охлажденные пробирки и центрифугировалась в течение 30 мин. при 3000 об/мин. Клеточный осадок фиксировали в 2,5 % растворе глютаральдегида с последующей дополнительной фиксацией в 1 % растворе четырехокиси осмия в течение 2-х часов, промывали в 0,2М фосфатном буфере и проводили через спирты возрастающей концентрации и ацетон с целью обезвоживания. Затем образец помещали на 24 часа в смесь аралдита и ацетона в соотношении 1:1, после чего заключали в аралдит с полимеризацией при 37°С в течение суток, а затем при 50-60°С в течение 2-3 суток. Ультратонкие срезы получали на ультратоме Leica EM UC6, контрастировали цитратом свинца И исследовали В электронном микроскопе. Исследования проводились совместно С.В.Пичуговой С И И.В.Зубаревым.

Проведение субхронических экспериментов

ΗЧ МЧ Водные суспензии изучаемых или вводили крысам внутрибрюшинно в дозах, соответствующим задачам экспериментов по 3 раза в Контрольным животным аналогичным образом неделю. вводили соответствующей объем той же стерильной деионизированной воды, на которой готовились суспензии. Каждой крысе всего осуществлено не менее 18 введений.

Введение в брюшную полость осуществлялось инъекционными шприцами. Место прокола протирали спиртом. Для того чтобы внутренности брюшной полости сместились к диафрагме, животных наклоняли головой и передним концом туловища вниз так, чтобы задняя часть туловища была выше передней. Пальцами левой руки захватывали всю брюшную стенку в складку и у основания ее делали прокол, направляя иглу параллельно складке. Внутрибрюшинное введение производили в задней трети живота, несколько отступив от срединной линии.

Проведение хронических ингаляционных экспозиций

количественных особенностей отложения ΗЧ глубоких Анализ В дыхательных путях, их длительной задержки в легких, перераспределения между другими органами и выведения из организма при прерывистой ингаляционной экспозиции в течение значительной части жизни, наиболее важной, с позиций труда, требовал промышленной токсикологии И гигиены проведения соответствующего хронического ингаляционного эксперимента. Для такого эксперимента потребовалась установка, обеспечивающая:

(а) поступление вещества в организм только через органы дыхания (то есть не допускающая загрязнения им поверхности тела с последующим слизыванием с нее, и возможной транскутанной пенетрации в кровь);

(б) равномерность экспозиции всех животных подопытной группы;

(в) стабильность экспозиции в течение ингаляционного периода.

Этим условиям отвечала ингаляционная система типа «только нос» с автоматической регулировкой всех параметров экспозиции.







(б)

Рисунок 2.2.1 – Ингаляционная установка типа «только нос»: (а) общий вид (со снятыми створками вытяжного шкафа); (б) крысы в рестрейнерах



Рисунок 2.2.2 – Схема подачи воздуха в ингаляционную установку, показанную на Рисунке 2.2.1

Все хронические ингаляционные экспозиции проводились по 4 часа в день, 5 раз в неделю в ингаляционной системе типа «только нос» CH Technologies, USA с автоматической регулировкой всех параметров экспозиции. Аналогичная установка использовалась для квази-экспозиции контрольных крыс (Рисунки 2.2.1 и 2.2.2).

Витающие НЧ Fe₂O₃ (14±4 нм) или NiO (23±5 нм) генерировались с помощью электрического искрения между соответствующими исследуемыми металлическими стержнями 99,99 % чистоты в атмосфере азота, разбавлялись увлажненным воздухом и подавались его потоком в ингаляционную установку с пеналами для 60 крыс. Средние концентрации (±s_x) составляли Fe₂O₃ 1,14±0,01 мг/м³, NiO 0,23±0,01 мг/м³; экспозиции проводили в течение 10 месяцев с промежуточными сроками исследования в 3 и 6 месяцев.

Для выбора концентрации в эксперименте НЧ NiO предварительно был проведен пилотный эксперимент с 5-кратным воздействием при концентрации 1,00±0,12 мг/м³. Концентрации определяли ежедневно методом атомноабсорбционной спектрометрии.

Химическая идентичность НЧ, отобранных на поликарбонатные фильтры, устанавливалась с помощью Рамановской спектроскопии.

Показатели токсичности

В субхронических внутрибрюшинных и хронических ингаляционных экспериментах органо-системные токсические эффекты воздействия изучаемых частиц оценивались после завершения экспозиционного периода по большому числу функциональных и биохимических показателей.

В течение периода затравки велось наблюдение за общим состоянием крыс и проводился контроль веса животных (последнее непосредственно перед умерщвлением).

После завершения периода экспозиций для изучения функционального наиболее состояния центральной нервной системы использовали часто применяемый в экспериментальной токсикологии суммационно-пороговый показатель (СПП) (Елизарова О.Н., 1974). Высшая нервная деятельность характеризовалась показателем исследовательского поведения животных «норковый рефлекс», который оценивался числом заглядываний в отверстия («норки») специальной испытательной доски за 3 минуты (Методические рекомендации, 1980).

Раздельный сбор мочи и экскрементов на протяжении 24 часов для измерения диуреза и удельной плотности мочи, а также суточной экскреции токсичных металлов. Затем крыс умерщвляли быстрой перерезкой шейных сосудов, собирали кровь, вскрывали полости для извлечения и взвешивания внутренних органов и мозга.

С помощью автоматического гематологического анализатора МҮТНІС-18 определяли гемоглобин, гемотокрит, средний объем эритроцитов, тромбокрит, тромбоциты, лейкоциты, эритроциты. Кроме того, в мазках крови, окрашенных по Гимза-Романовскому, подсчитывалась лейкоцитарная формула крови, а при суправитальной (т.е. без предварительной фиксации) окраске бриллианткрезиловым синим подсчитывали число ретикулоцитов считали на 1000 эритроцитов.

Проводилось цитохимическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови, основанное на

восстановлении *пара*-нитротетразолия фиолетового до формазана и подсчете гранул последнего при оптической микроскопии с иммерсией. В качестве показателей состояния биоэнергетического и окислительно-восстановительного обмена использовали определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) лимфоцитов крови, которая является «энзиматическим зеркалом» организма. СДГ – один из ключевых ферментов, уровень активности которого отражает интенсивность окислительно-восстановительных реакций, связанных с метаболизмом янтарной кислоты в цикле трикарбоновых кислот. Активность СДГ оценивали цитохимически с использованием пара-нитрофиолетового тетразолия и выражали количеством гранул формазана в 50 клетках (Нарциссов Р.П., 1969).

сыворотке венозной крови, полученной при перерезке шейного В сосудисто-нервоного пучка, умерщвленных назавтра после завершающей инъекции или экспозиции, в сыворотке крови определяли содержание общего белка и соотношение белковых фракций (альбуминов и глобулинов) - альбуминглобулиновый индекс, активность аминотрансфераз – аланинаминотрансферазы (АлТ) (AcT), аспартатаминотрансферазы И активность гаммаглутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, билирубина, SH-группы (Ellman G., 1979), активность каталазы (Меньшиков В.В. с соавт., 1987), малонового диальдегида (Андреева Л.И., 1988) и церулоплазмина (Бестужева С.В., 1976). Все указанные анализы проводились при помощи биохимического анализатора «Кобас Интегра» с использованием соответствующих диагностических наборов, кроме SH-группы в сыворотке крови, малонового диальдегида и церулоплазмина.

Проводили также определение содержания дельта-аминолевуминовой кислоты в моче (Павловская Н.А., 1998), свидетельствующая о состоянии порфиринового обмена, лежащего в основе образования гема.

Выделительную функцию почек оценивали по содержанию эндогенного креатинина в сыворотке крови и суточного креатинина в моче.

Как в интраперитонеальных, так и в ингаляционных экспериментах, содержание вводимых в организм металлов в органах и в выделениях определяли с помощью атомной эмиссионной или адсорбционной спектроскопии

(спектрофотометр AA-6650, фирма Shimadzu №А30483900296 (Свидетельство о поверке № 427374 до 10.07.14 г.), а в случае железа и никеля – также электронного парамагнитного резонанса (ЭПР-спектрометрии).

Генотоксикологическое исследование

В субхронических экспериментах с частицами серебра, золота, оксидов меди, а также в хронических экспериментах с оксидами железа и никеля оценивалась фрагментация геномной ДНК в клетках различных тканей с помощью ПДАФ-теста. Этот метод нашел широкое применение, как в биологии, так и судебной медицине.

Основной причиной, приводящей к возникновению полиморфизма ДНК, первоначально считались точковые мутации (а также микроделеции и инсерции), затрагивающие сайты узнавания тех или иных эндонуклеаз рестрикции (Botstein D. et al.,1980). В последующих работах спектр возможных причин был расширен – оценивались крупные делеции и вставки, трансверсии, транслокации, транспозиции и т.п. (Wallace R.B., 1983).

Диагностические возможности данной технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах (Anolles G. et al., 1991; Waugh R. et al., 1992; Welsh J.et al., 1990.; Williams I. et al., 1990) и широко используется в настоящее время для решения целого ряда задач (Wang S., 2017; Sharifiyazdi H., 2018; Ningombam S.S., 2018).

Органы для исследования извлекали из тела (в течение 2-3 минут после умерщвления крыс перерезкой шейного сосудисто-нервного пучка) в специальные охлажденные до – 80°С сосуды, которые в криоконтейнерах срочно доставлялись в Отдел молекулярных и клеточных технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Выделение геномной ДНК

Образцы солидных органов измельчали скальпелем. Затем, с целью получения однородной массы, образцы четырехкратно подвергали замораживанию в жидком азоте (программный замораживатель Niocon) и оттаиванию в водяной ультразвуковой ванне (38°C) в растворе PBS (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺

free, Sigma) с последующим пропусканием через иглы уменьшающегося диаметра.

Клетки костного мозга вымывали из бедренной кости после отсечения эпифизарных и диафизарных участков раствором PBS (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free, Sigma) с последующим пропусканием через иглы уменьшающегося диаметра.

Для выделения ДНК из культур клеток использовали набор реагентов GenElute (Sigma) согласно рекомендованному протоколу фирмы-изготовителя. В полученных образцах спектрофотометрически определяли количество ДНК (Ultraspec 1100 pro), замораживали и хранили при -84°C в кельвинаторе (Sanyo) до начала исследования.

ПДАФ анализ

Рандомизированные олигонуклеотидные и NotI-STS праймеры конструировали on line с помощью сервиса Oligo version 3.0 (www.oligo.net) и синтезировали на автоматическом синтезаторе ASM 800 (фирма «Биоссет»).

Выбор оптимального режима амплификации проводили, исходя из длины амплифицируемого фрагмента после пробного цикла моделирования температурного градиента. Стадии начальной денатурации (2 мин. при 94°С) и конечной полимеризации (3 мин. при 72°С) были обязательными в каждом пробном цикле амплификации. Количество циклов подбирали эмпирически для наибольшего выхода специфичного ампликона при минимальном содержании неспецифических фрагментов. Смесь в количестве в 25 мкл помещали в амплификатор с заданной программой температурно-временных циклов: $T_{ден}94^{\circ}C - 2$ мин; ($T_{ден} 95^{\circ}C - 0,2$ мин, $T_{отж}64^{\circ}C$, $T_{элон} 72^{\circ}C - 0,5$ мин) – 29 циклов, $T_{элон} 72^{\circ}C - 3$ мин.

С целью повышения чувствительности при постановке реакции использовали специфические праймеры и нуклеотиды (dCTP, dATP, метил-dTTP, Amersham), меченые тритием. Полученный амплификат был разделен в процессе горизонтального агарозного гель-электрофореза в TAE-буфере при 100 В в течении 15 мин. По окончании электрофореза гелевые пластины были разделены на дорожки, каждая из которых была разрезана на участки длиной 5 мм.

Фрагменты геля помещали во флаконы, содержащие 3,0 мл абсолютного изопропанола. Флаконы нагревали до 80°С в течении 2 часов. После экстракции из геля амплифицированных фрагментов, содержащих изотопную метку, во флаконы добавлялся простой толуоловый сцинтиллятор (6,0 мл). Регистрация результатов производилась на автоматическом жидкостном сцинтилляционном счетчике «Бета-2».

В отличие известных методов, основанных на визуальной идентификации степени повреждения ДНК клеток, использованная модификация позволяет количественно определить степень фрагментации ДНК, то есть количественно оценить степень генотоксичности используемых повреждающих агентов и воздействие исследованных препаратов. Основой технологии является то, что в отличие от фрагментированной («хвостовой») ДНК, нефрагментированная ядерная ДНК имеет крайне низкую степень миграции в агарозном геле, причем степень миграции прямо пропорциональна степени ее повреждения.

Как свидетельствует опыт, прямое сравнение между группами по активности включенной метки в ядерные и хвостовые части исследуемых образцов не всегда информативно. Поэтому чаще используется значение соотношения ядерной и хвостовой частей в рамках одной группы – коэффициент фрагментации ДНК (Кфр), рассчитываемый по формуле:

Кфр=СуммАхф/Аядр

где Кфр – коэффициент фрагментации;

СуммАхф – суммарная радиоактивность «хвостовых» фракций;

Аядр – радиоактивность «ядра».

Методика гистологического исследования (с помощью к.м.н. И.Е. Валаминой)

Кусочки органов фиксировались в 10 % нейтральном формалине и подвергались стандартной процедуре уплотнения, заключения в парафин и приготовления тонких тканевых срезов, которые окрашивались гематоксилиномэозином, а при необходимости – пикрофуксином по Ван Гизону или Шифф – иодной кислотой (ШИК-реакция) для описательной характеристики микроскопической структуры органов и для морфометрии с использованием окулярного микрометра и сетки Автандилова.

В ингаляионном эксперименте при оценке токсичности наночастиц NiO (совместно с Р.Р.Сахаутдиновой) проведена оценка не только in situ на гистологических препаратах, но и путем цитологического анализа тканевых отпечатков. Для этого с поперечных срезов легких, печени, почек, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов делались мазки-отпечатки, которые высушивались при комнатной температуре и окрашивались по Лейшману. Клеточный состав и признаки повреждения клетки оценивали в световом бинокулярном микроскопе Carl Zeiss Primo Star с системой визуализации видеокамерой USCMOS при увеличении x100 и x1000. При микроскопировании подсчитывали 100 клеток с каждого мазка лимфоузлов и 300 клеток с мазков остальных органов. Эта техника известна из литературы (Гонохова М.Н., 2013; Кругликов Г.Г., 2014; Досынбаева Г.Н., 2016), но случаи ее использования в нанотоксикологических экспериментах не встречалось.

Проведено также электронно-микроскопическое изучение накопления НЧ в этих органах и ультраструктурных патологических изменений в них (к.б.н. И.В.Зубаревым).

Оценка эффективности биопрофилактических комплексов

Для оценки противотоксического действия биопротекторов в сериях с воздействием серебра, оксида меди при внутрибрюшинном введении и оксида никеля – при ингаляционном или интратрахеальном введена дополнительная группа животных, которая параллельно была проведена через соответствующий эксперимент и подверглась аналогичному воздействию НЧ на фоне перорального получения биопрофилактического комплекса (БПК).

Обоснование выбора биопротекторов

Используемые препараты должны обеспечивать торможение или блокирование нарушений, играющих важную роль в токсикодинамике данного химического агента; способствовать повышению неспецифической устойчивости организма к токсическому действию исследуемых наночастиц; оказывать

стимулирующее действие на токсикокинетические процессы, т.е. способствовать снижению задержки НЧ и освобождению организма от них. Предполагалось также, что некоторым препаратам могут быть присущи и многосторонние эффекты действия организм. Важным отбора на условием средств биопрофилактики являлось использование для испытания только таких препаратов, безвредность которых установлена достаточно широким опытом их использования в различных целях и признана Министерством здравоохранения Российской Федерации.

Пектины относятся к природным полисахаридам, которые содержатся почти во всех растениях. Основной составной частью пектиновых веществ является D-галактуроновая кислота. Попадая в желудочно-кишечный тракт, пектин образует гели. Диметоксилирование пектина способствует его превращению в d-полигалактуроновую кислоту, которая и соединяется с тяжелыми металлами, в результате чего образуются нерастворимые комплексы, не всасывающиеся через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта и выделяющиеся из организма с калом. Защитное действие пектинов объясняется также их способностью вместе с другими пищевыми волокнами улучшать перистальтику кишечника и реологические свойства желчи, способствуя быстрому выведению всех токсичных веществ (Донченко Л.В. с соавт., 1993; Трахтенберг И.М. с соавт., 1995; Нелина В.В., 1996; Кушнева В.С., Колтунова И.Г., 1997; Трахтенберг И.М. с соавт., 1998; Сухарева Н.И., 1998; Дегтярева Т.Д., 2002; Киреева Е.П., 2007). В экспериментах был использован «Пектин яблочный» производства ООО «Промавтоматика» (г. Белгород, Россия).

Глютаминовая кислота и глутаминат натрия (натриевая соль глютаминовой действующих кислоты) относятся К числу веществ, одновременно как стимуляторы окислительно-энергетического обмена И как естественные метаболиты, физиологически активные повышающие неспецифическую сопротивляемость активность компенсаторно-репаративных И процессов. Находясь в центре азотистого обмена, глютаминовая кислота тесно связана с углеводным, жировым, минеральным, энергетическим и другими видами

метаболизма. Благодаря многообразному участию в обменных процессах, она может при изменении функционального состояния организма вступать в противоположные метаболические различные диаметрально превращения (Волков М.С. с соавт., 1975). Поливалентный характер биологического действия глутамината обусловливает применение его при многочисленных патологических состояниях (Мирогов Ю.В., Яснецов В.С., 1985; Чекман С.С., 1986; Гусель В.А., Маркова И.В., 1989; Медведева В.Н., 1990). Глутаминат широко используется в качестве добавки к пищевым концентратам и готовым блюдам с целью улучшения их вкуса и в виде источника легко усвояемого азота (Волков М.С., 1975; Западнюк В.И. с соавт., 1982; Ghezzi P. et al, 1985; Маджи Д.Э., 1987), что указывает на его безвредность, а также доступность при широком использовании. Нельзя не отметить, что свободный глутаминат (глютаминовая кислота) относится к натуральным компонентам, обнаруженным во многих продуктах питания. Безвредность длительного приема (в дозах до 3-6 г в сутки) для людей всех возрастов, включая детей, была продемонстрирована результатами исследований, проведенных Объединенным экспертным комитетом по изучению добавок (Консультативный Центр BO3 пищевых И пищевого сельскохозяйственного отдела ООН).

Принимая во внимание, что применение свободной глутаминовой кислоты является недостаточно эффективным ввиду ее слабой растворимости и медленного усвоения (Демченко Н.П., 1970; Ждахина К.С., 1966), была использована хорошо растворимая натриевая соль данной кислоты.

В последние годы показана высокая эффективность глутамината не только при изолированных интоксикациях, а также при включении ее в состав биопрофилактических комплексов при длительном воздействии комбинаций различных металлов (Кацнельсон Б.А. с соавт., 1999; 2004).

Глутаминат натрия (ГН) получали путем предварительной нейтрализации глутаминовой кислоты гидрокарбонатом натрия и давали крысам с питьевой водой в концентрации 0,1 М (или 1,5 % раствор по глутаминовой кислоте в дозе 12-14 мл на крысу). Эффективность применения глутамината в таких дозировках

доказана по литературным данным (Морозова К.И., 1984; Кацнельсон Б.А. с соавт., 1999).

Патогенетическая роль свободных кислородных радикалов в механизмах цитотоксического и гентоксического действия является основанием для поиска путей коррекции этих процессов экзогенными антиоксидантами. Повышения эффективности антиоксидантного воздействия можно добиться благодаря применению комплекса веществ, участвующих в разных звеньях системы антиоксидантной защиты.

Аскорбиновая кислота (витамин С) играет важную роль в регулировании окислительно-восстановительных процессов и предохраняет мембраны клеток и, в частности, лимфоцитов от повреждающего действия перекисного окисления. Это является основой иммуномодулирующих эффектов витамина С, которые проявляются в действии на гуморальные и клеточные механизмы иммунитета, Витамин С лимфоцитов, хемотаксис. индуцирует миграцию синтез И освобождение интерферона и активирует систему комплемента. Под его влиянием повышается фагоцитарная активность нейтрофилов. В Государственном реестре лекарственных средств (2009) указано, что аскорбиновая кислота обладает антиоксидантными свойствами, участвует в регулировании выраженными оксилительно-восстановительных и метаболических процессов. В зарубежных исследованиях было показано защитное действие витамина С против острой и хронической токсичности никеля (Hattiwaleet S.H. al., 2013; Kadi I.E. and Dahdouh F., 2016). Одновременное введение L-аскорбиновой кислоты и сульфата никеля значительно улучшило все вышеперечисленные биохимические параметры наряду с гистопатологией тканей легких крыс, получавших только сульфат никеля. Исследование четко показало защитную роль L-аскорбиновой кислоты в отношении нитрозативного стресса, вызванного никелем, в тканях легких (Hattiwale S.H. et al., 2013).

Для подавления свободнорадикальных реакций в липидном бислое целесообразно использовать жирорастворимые антиоксиданты такие как ретинол и токоферол (Евстигнеева Р.П. с соавт., 2003).

Доказано также, что при комбинации витаминов А и Е можно достичь потенцирования антиоксидантного эффекта в случае избытка токоферола, тогда как избыток ретинола будет снижать антиоксидантные свойства композиции (Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 2003; Евстигнеева Р.П. с соавт., 2003).

Активность жирорастворимых антиоксидантов значимо возрастает при сочетанном применении с селенитом натрия. Селен функционально взаимосвязан с витамином Е и серусодержащими аминокислотами: ингибируя цепи ПОЛ на различных звеньях (Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 2003).

Селен входит состав активного центра фермента В ключевого антирадикальной защиты глутатионпероксидазы, повышение активности которой реципрокно активирует другие ферменты обмена глутатиона. Благодаря своим прооксидантным эффектам селен в микроколичествах способен стабилизировать степень окисления металлов переменной валентности, предотвращая реакции Фентона с образованием самого сильного биологического окислителя – гидроксильного радикала. Будучи аналогом серы селен способен образовывать селеноспирты и селенокислоты, а восстановительные свойства группы SeH, заметно выше, чем у тиольной группировки SH. Селен способен образовывать соединения с серусодержащими белками по типу селенотрисульфидов и тем самым регулировать стабильность и проницаемость мембран и влиять на активность серусодержащих ферментов (Ansar S. et al., 2017).

Антиоксиданты и селен были использованы в виде препаратов «Триовит» (АО «КРКА д.д. Ново место», Словения), «АлфаВит Классик» (ООО «Русфик», г. Москва, Россия), «Компливит Селен» (ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», г. Уфа, Россия).

В состав комплекса против токсического действия наночастиц оксида никеля вошел рутин (рутозид), представляющий собой гликозид кверцетина и относится к группе флавоноидов. Известно около 180 гликозидов кверцетина, и лишь некоторые из них, подобно рутину, играют важную биологическую роль (Auger C.L. et al., 2005). Эта группа химических веществ занимает ведущее место среди экзогенных природных антиоксидатов, обладает широким спектром

биологического действия, в том числе антирадикальной активностью (Ильясов И.Р., 2009).

В биофлавоноиды настоящее время используются качестве В бактерицидных, иммуностимулирующих, противоопухолевых, кардио-, радио-, геропротекторных, антитромботических, гепато-И антиаллергических И антивирусных средств (Афонина С.Н., Лебедева Е.Н., 2016; Тараховский Ю.С., 2013). Антиоксидантные свойства определяются не только способностью удалять свободные радикалы путем непосредственного взаимодействия с ними, но также способностью связывать и удалять из среды ионы металлов, инициирующих появление свободных радикалов (Тараховский Ю.С., 2013). К тому же рутин используют для лечения и профилактики неврологических заболеваний (Su K.-Yi, 2018). Препараты, в состав которых входят витамины группы Р, рекомендуется принимать вместе с аскорбиновой кислотой. В силу своих антиоксидантных свойств рутин предохраняет аскорбиновую кислоту от избыточного окисления, способствуя сохранению ее биологической активности и депонированию в тканях организма, а также участвует вместе с ней в окислительно-восстановительных процессах, уменьшает проницаемость и ломкость капилляров. В свою очередь, аскорбиновая кислота не только обладает выраженными антиоксидантными свойствами, участвует в регулировании оксилительно-восстановительных и метаболиечских процессов, но и усиливает эффекты рутина (Государственный реестр лекарственных средств, 2009).

Рутин был использован в виде препарата «Аскорутин» (ОАО «Марбиофарм», г. Йошкар-Ола, Россия), состоящий из рутина и аскорбиновой кислоты в дозировке по 50 мг.

Особую роль в функционировании как вне-, так и внутриклеточных антиоксидантных систем организма играют соединения, в состав которых входят SH-содержащие аминокислоты: цистеин, цистин, метионин. Установлено, что SH-содержащие соединения подвергаются окислению в первую очередь, предохраняя тем самым другие функциональные группы и молекулы (Arnhold J. et al., 1991).

Сдвиги равновесия между SH- и SS-формами тиолов приводят к радикальной перестройке режимов жизнедеятельности клетки: изменению функционального состояния клеточных рецепторов и факторов транскрипции, активности ферментов (в т.ч. антиоксидантных), проницаемости клеточных мембран, интенсивности метаболических процессов (Котеров А.Н., Филлипович И.В., 1995).

SH-содержащим соединениям принадлежит ведущая роль в защите клеток радикала ОН. восстановлении окисленных ОТ форм других жиро-И водорастворимых антиоксидантов, в поддержании специфической активности также В обеспечении функционирования антиоксидантных ЭНЗИМОВ, a биохимических механизмов (Зенков Н.К. с соавт., 2004; Меньщикова Е.Б. с соавт., 2006).

В составы биокомплексов был включен цистеин (использованный в высоко активной и метаболически хорошо доступной форме N-ацетилцистеина), который является предшественником глютатиона, являющегося мощным протектором клетки от оксидативного стресса, служащего, по современным представлениям, одним из основных первичных механизмов токсичности и генотоксичности металлических наночастиц (Fröhlich E., 2013).

Также в составы БПК был включен глицин – аминоуксусная кислота, предшественник глютатиона, регулятор обмена веществ, нормализатор и активатор процессов защитного торможения в центральной нервной системе. Глицин обладает глицин- и ГАМКэргическим, альфа 1- адреноблокирующим, антиоксидантным, антитоксическим действием; регулирует деятельность глутаматных рецепторов. Включение глицина в БПК обусловлено тем, что он является одним из предшественников глутатиона, и его назначение, вероятно, повышает резерв глутатионовой конъюгации (Минигалиева И.А., 2009).

В экспериментах были использованы препараты «Глицин» (ОАО «Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко», г. Москва, Россия) и АЦЦ Лонг (Сандоз, Любляна, Словения).

Полиненасыщенные жирные кислоты класса омега-3 вошли в составы комплексов исходя из того, что их внутриклеточными производными являются эйкозаноиды, которые активируют репликацию ДНК и тем самым способствуют репарации ее токсического повреждения, как это было ранее подтверждено нами В экспериментах с некоторыми другими генотоксичными факторами. Эйкозапентаеновая кислота, входящая состав препарата, участвует В В формировании клеточных мембран, регулировании воспалительных реакций, улучшении всасывания жиров и жирорастворимых витаминов в желудочнокишечном тракте. Докозагексаеновая кислота участвует в нормализации микроциркуляции обладает крови, мембранозащитным, антиаритмическим, антиатеросклеротическим; иммуномодулирующим, противовоспалительным, противоаллергическим, антидепрессантным действием; предотвращает накопление жира В организме (Государственный реестр лекарственных средств, 2009). Полиненасыщенные жирные кислоты класса омега-3 вошли в состав биопрофилактических комплексов в виде препарата рыбьего жира «Янтарная капля» (ООО «Экко плюс», г. Жуковский, Россия), в состав которого помимо ПНЖК омега-3 включены витамины A и D.

Йод – жизненно важный микроэлемент. Без йода невозможна нормальная работа щитовидной железы, гормоны которой выполняет множество жизненно важных функций. Они отвечают за обмен белков, жиров, углеводов и энергии в организме. Эти гормоны регулирует деятельность головного мозга, нервной и сердечно-сосудистой системы, половых и молочных желез, рост и развитие ребенка. Из литературы и собственных исследований известно, что свинец тормозит функцию и повреждает строение щитовидной железы, а йодсодержащая добавка может существенно ослабить этот токсический эффект (Кацнельсон Б.А. с соавт., 1999). Экспериментально доказано повреждающее действие токсических комбинаций на структуру и гормональную функцию щитовидной железы, которое ослабляется существенно под влиянием комплекса биопротекторов, В особенности, при включении в него препарата йода (Кацнельсон Б.А. с соавт.,

2004). Йод был использован в виде препаратов «Йодид калия» (ООО «Озон», г. Жигулевск, Россия) и «АлфаВит Классик» (ООО «Русфик», г. Москва, Россия).

Составы БПК имели много общего, различаясь в некоторых существенных деталях соответственно специфическим токсикодинамическим и токсикокинетическим особенностям действия конкретных металлов.

Оценка статистической значимости межгрупповых различий средних показателей оценивалась при парном сравнении отдельных показателей с помощью *t*-теста Стьюдента либо при множественном сравнении с поправкой Бонферрони.

Резюме

Дана краткая характеристика используемых биологических объектов токсического воздействия и изучаемых металлических/металлооксидных частиц. Описан общий дизайн острых, субхронических и хронических экспериментов с указанием серий и объема исследований, перечислены использованные в этих экспериментах показатели развития интоксикации.

Более подробное описание дизайнов экспериментов будет дано в последующих Главах диссертации.

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА РЕАКЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ФАГОЦИТОЗА НА ОТЛОЖЕНИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ/МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ГЛУБОКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЯХ

В самом начале «нанотоксикологической эпохи» многими авторами (например, Donaldson K. et al., 2004; Oberdörster G. et al., 2005) предполагалось, что те защитные механизмы, которые дают животному организму возможность атмосфере, существовать В земной неизбежно загрязненной нормально взвешенными частицами широкого диапазона размеров и разного химического состава, по тем или иным причинам мало эффективны или вообще не эффективны по отношению к НЧ (Oberdörster G. et al., 2005), к 2012 г Fadeel В.не считал решенным вопрос о том, «узнаются ли НЧ фагоцитами или пролетают под радаром и избегают иммунного распознавания» (Fadeel B., 2012).

Позвоночные животные суши начали ингалировать так называемые ультратонкие частицы нанометровых размеров (вулканическая зола, высохшие капельки диспергированной морской воды, дым лесных пожаров, сульфаты, образовавшиеся в атмосфере в результате окисления диоксида серы) тогда же, когда и микрометровые частицы пыли. Между тем, оба ключевых механизма самоочищения дыхательных путей OT частиц (легочный фагоцитоз И мукоцилиарный транспорт) существуют уже у земноводных (Kilburn K.H., 1969), то есть были выработаны эволюцией еще до завершения морфологического структурирования легких. Было трудно понять, каким образом естественный отбор закрепил бы именно эти защитные механизмы, если бы они были предположительно неэффективными как против наиболее раз опасных мельчайших частиц, загрязняющих атмосферный воздух.

3.1. Цитологические и биохимические характеристики жидкости бронхоальвеолярного лаважа

Мобилизация фагоцитоспособных клеток в глубокие дыхательные пути, проявляющаяся увеличением числа клеток в жидкости, получаемой при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ), является типичной реакцией на отложение в них любых частиц, причем как общая клеточность, так и ее сдвиг в сторону полиморфоядерных, главным образом, нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) тем более выражены, чем выше для альвеолярного макрофага (АМ) цитотоксичность этих частиц (Привалова Л.И., 1979; Katsnelson B.A. et al., 1984; Привалова Л.И., 1990). Такая зависимость фагоцитарной реакции от количества разрушенных АМ была экспериментально моделирована при интратрахеальном введении продуктов замораживанием-оттаиванием разрушения повторным ИЛИ ультразвуком асептически полученных перитонеальных макрофагов (без их преинкубации с какими-либо частицами) и особенно при введении липидов, экстрагированных из этих продуктов (Привалова Л.И., 1979; Katsnelson B.A. et al., 1984; Привалова Л.И., 1990).

С одной стороны, эта дозо-зависимая имитация продуктами макрофагального разрушения особенностей мобилизации фагоцитов, вызываемой цитотоксичными частицами, а с другой – продемонстрированная в тех же исследованиях хорошая ранговая корреляция между нейтрофильным сдвигом *in* vivo и способностью разных пылевых частиц повреждать перитонеальный макрофаги in vitro, оцененной с помощью т.н. трипанового теста, оправдывают НЛ/АМ использование отношения В косвенного. качестве но высоко информативного критерия сравнительной цитотоксичности пыли.

Оценка *in vivo* на основе сдвигов клеточной популяции БАЛЖ считатается наиболее надежной, если изучается влияние частиц на механизмы самоочищения легких.

Судя по отношению НЛ/АМ, цитотоксичность частиц *in vivo* снижается с увеличением их размера. Так, при интратрахеальном введении частиц магнетита (Fe₃O₄) в дозе 5 мг/кг (2 мг/мл на 1 животное) цитотоксичность возрастает в порядке: 1000 нм < 50 нм < 10 нм (Таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1 – Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 2 мг частиц Fe_3O_4 различных размеров в 1 мл воды, $(\overline{X\pm}S_x)$

	Число клеток x10 ⁶			
Введенное вещество	Общее число клеток	Альвеолярные макрофаги (АМ)	Нейтрофильные лейкоциты (НЛ)	Отношение НЛ/АМ
Вода (контроль)	2,53±0,36	2,06±0,29	0,30±0,05	0,15±0,03
10 нм	18,57±3,20*□	2,72±0,54	14,99±2,57*□	6,23±0,62*□
50 нм	26,37±5,12*□	5,05±0,93*□	20,65±4,37*□	4,42±0,57*□
1 мкм	4,06±0,44*•	1,81±0,24	1,93±0,28*•	1,32±0,27*•

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль»; • — с группой «50 нм»; \Box — с группой «1 мкм» (при p < 0.05 по t-критерию Стьюдента).

Обращает на себя внимание тот, на первый взгляд, парадоксальный факт, что если обе фракции наночастиц магнетита вызвали значительно большее увеличение клеточности БАЛЖ по сравнению с контрольным показателем, чем частицы диаметром 1 мкм, то при сравнении между собой реакции на разные по размеру НЧ аналогичного повышения этого показателя с уменьшением диаметра от 50 до 10 нм не выявлено (Рисунок 3.1.1).

Более того, реакция на 10-нанометровые НЧ оказалась менее выраженной, причем это различие имеет один и тот же знак для общего числа клеток, числа АМ и числа НЛ, будучи по числу АМ статистически значимым. Между тем, показатель НЛ/АМ, рассматриваемый в качестве критерия цитотоксичности частиц, наоборот, значимо выше при введении 10-нанометровых частиц.

Наиболее правдоподобным объяснением этому представляется то, что к моменту проведения лаважа глубокие дыхательные пути уже освободились от существенной доли частиц, причем это освобождение было более полным в случае мельчайших наночастиц, несмотря на большую их цитотоксичность, и произошло это потому, что их растворение и связанная с ним элиминация происходили более интенсивно.

Как видно из Таблицы 3.1.2, эта гипотеза была подтверждена в специально для такой проверки поставленном эксперименте: надфоновое (сверх контрольного уровня) содержание железа через 24 часа после введения магнетита было в случае 10-нанометровых частиц вдвое ниже, чем в случае 50-нанометровых и 1-микрометровых (при отсутствии различия между двумя последними).

Таблица 3.1.2 – Содержание железа в легочной ткани крыс через 24 часа после интратрахеального введения крысам 2 мг частиц Fe_3O_4 различных размеров в 1 мл воды, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Группы крыс, которым были введены суспензии частиц диаметром:					
10 нм	50 нм	1 мкм	Контроль (вода)		
Содержание железа (мг/кг сырой ткани)					
$200 \pm 9*$	257 ± 8*•	$258 \pm 15^{*\bullet}$	141 ± 5		
Разность между группой, получившей магнетит, и контрольной					
59 ± 10	$116 \pm 9^{\bullet}$	$117 \pm 16^{\bullet}$	-		

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «10 нм» (P<0,01 по t-критерию, учитывающему стандартную ошибку сложных средних, при котором данные по каждой крысе рассматриваются как выборка, состоящая из 5 определений).

То, что различный для разных модификаций кремнезема баланс между элиминацией и цитотоксичностью может обусловить парадоксальные, на первый взгляд, результаты сравнительной оценки их способности вызывать развитие хронических гистопатологических изменений в легких, известно давно (Katsnelson B.A. et al., 1984) и является вероятным объяснением того, почему (Warheit D.B. et al., 2007; 2009) нашли эту способность убывающей в последовательности: нано-кварц 12 нм > Кварц Min-U-sil 500 нм > «тонкий» кварц 300 нм > нано-кварц 50 нм. В свете нашего исследования интересно отметить, что последнее место в этой последовательности заняли нано-частицы карбонильного железа. Это один из фактов, свидетельствующих о том, что сама по себе нано-размерность материала не обязательно определяет его высокую био-агрессивность.

Возвращаясь к той доле кинетики задержки и элиминации частиц, которая контролируется не их растворением, а фагоцитарной функцией альвеолярных макрофагов и нейтрофильных лейкоцитов, необходимо подчеркнуть, что сравнительные вклады соответствующих клеточных пулов в эту кинетику зависят не только от численного соотношениям между ними (показателя HЛ/AM), которое, как видно из Таблицы 3.1.1, через 24 часа после инстялляции наночастиц обоих размеров (но в особенности, 10-нанометровых) значительно превышает 1,0, но и от их сравнительной фагоцитарной активности.

Как видно из Таблицы 3.1.3 и Рисунка 3.1.1, отмечается нагрузка нейтрофилов видимыми под световым микроскопом частицами чего никогда не наблюдалось ранее в ингаляционных экспериментах с кварцевыми пылями. Отметим, что наши данные о более высокой нагрузке АМ при интратрахеальном ведении наночастиц магнетита по сравнению с микрочастицами, согласуются с результатом, полученным Zhu M.T. et al. (2008) при таком же введении в 2 раза более высоких доз другого оксида железа.

Таблица 3.1.3 – Процентное распределение фагоцитоспособных клеток с разной степенью нагрузки частицами через 24 часа после интратрахеального введения крысам 2 мг частиц Fe₃O₄ различных размеров в 1 мл воды, ($X_{cp} \pm S_x$)

Альвеолярные в	макрофаги (АМ)	Нейтрофильные лейкоциты (НЛ)				
% AM c 0 - 20	% AM c >20	% НЛ с 0 – 20	% НЛ с >20			
частицами	частицами	частицами	частицами			
Через 24 часа после введения частиц 10 нм.						
9,38±0,25 %□	90,62±0,35 %□	42,66±0,28 % [□]	57,34±0,38 % [□]			
Через 24 часа после введения частиц 50 нм.						
19,09±0,21 % ^{●□}	80,91±0,21 % ^{●□}	72,55±0,18 % [•] □	27,45±0,19 % [•] □			
Через 24 часа после введения частиц 1000 нм.						
64,00±0,16 %•	36,00±0,16 % [●]	97,75±0,08 %•	2,25±0,08 %•			

Примечание:

• – статистически значимое различие с группой «10 нм»; □ – с группой «1 мкм» (P<0,001 по t-критерию, учитывающему стандартную ошибку сложных средних, при котором данные по каждой крысе рассматриваются как выборка, состоящая из п клеток).

Необходимо подчеркнуть, что оба эффектора фагоцитарного механизма этого самоочищения, то есть АМ и НЛ, могут быть нагружены наночастицами в значительно большей степени, чем соответствующими МЧ в параллельно проведенном эксперименте. При этом, чем мельче действующие НЧ, тем более жадно они поглощаются клетками обоих типов.

До дальнейшего обсуждения этих данных необходимо остановиться на неизбежно возникающем вопросе о том, какие именно частицы мы могли распознать и сосчитать при увеличении всего в 1000 раз, при котором предметы размером 10 и 50 нм должны иметь кажущийся размер всего, соответственно, 1/100 и 1/20 миллиметра.



Рисунок 3.1.1 Процент фагоцитирующих клеток с разными уровнями нагрузки частицами в жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения частиц Fe₃O₄ разного размера.

10 Очевидно, что первичная частица HM может казаться ЛИШЬ светопреломляющей точкой, и поэтому вполне вероятно, что мы распознаем в качестве фагоцитированных НЧ, главным образом, не синглеты, а небольшие их делает суждение о более высокой фагоцитарной агрегаты. Однако ЭТО способности АМ и НЛ по отношению к НЧ по сравнению с микрочастицами, еще более обоснованным.

Наибольшие методические трудности, связанные с токсикологическим тестированием наночастиц и служащие наиболее существенным источником сомнений при трактовке его результатов, относятся к проблеме практически неизбежной коллоидальной нестабильности многих наносуспензий. Отмечается, в частности, что неучтенное дестабилизирующее нано-суспензию влияние высоко-ионных культуральных сред является одной из причин искажения результатов экспериментов *in vitro*, в которых изучается зависимость эффекта от размера наночастиц (Bastus N.G. et al., 2008). Чем мельче НЧ, тем выше их склонность к агрегации, а при работе с магнитными наночастицами она велика в особенности.

Для повышения стабильности наночастиц многими исследователями (например, Xie J. et al., 2006; 2008) успешно используется покрытие их поверхности гидрофильными макромолекулами, В том числе, В токсикологических экспериментах. Так, Choi W.S. et al. (2009) для сравнения цитотоксичности *in vitro* HЧ Fe₃O₄ и MnO именно с этой целью модифицировали их поверхность полиэтиленгликолевым дериватом фосфолипида. Однако следует опасаться. что такое модифицирование может существенно изменить интенсивность или даже характер взаимодействия поверхности наночастиц с клеткой и, по-видимому, неслучайно Choi W.S. et al. (2009) при интратрахеальной инстялляции 36-нанометровых супермагнитных железо-оксидных наночастиц, покрытых полимером, препятствующим ИХ обрастанию биологическими продуктами (anti-biofouling polymer), нашли, что это вещество обладает низкой токсичностью, хотя они и было термически конъюгировано с хлоротоксином. Mahmoudi M. et al. (2009) намеренно добились снижения токсичности HЧ Fe_3O_4

для клеточной линии мышиных фибробластов (L929) путем пассивирования поверхности этих наночастиц полиэтиленгликоль-кофумаратом.

Повышение стабильности наночастиц, сопровождающиеся подавлением их токсичности, представляет несомненный интерес в тех специальных случаях, когда ставится задача оценить токсичность конкретного нано-материала, на частицах которого то или иное покрытие адсорбировано с целью сделать этот материал более пригодным и/или менее опасным для его технологического, биомедицинского или иного использования. Однако такая методика стабилизации нежелательна, когда перед исследованием ставятся более общие задачи типа той, которая стояла перед нашим, или, когда токсикологический эксперимент проводится с целью оценки действия на организм ультратонких частиц, встречающихся в реальном воздухе рабочих помещений или в атмосферном воздухе.

В рамках таких задач значительно больший интерес представляет предложенная (Sager T.M. et al., 2007) методика получения стабильных суспензий НЧ сажи или TiO₂ в надосадочной жидкости от центрифугирования БАЛЖ крыс и мышей или, с худшим результатом, в забуференном физиологическом растворе, содержащем дипальмитоил фосфатидилхолин. Однако получение асептической бесклеточной БАЛЖ в объемах, достаточных для проведения экспериментов *in vivo* на десятках крыс, весьма затруднительно.

Мы прибегли к более простому пути относительной стабилизации наносуспензий, описанному в Главе 2: во-первых, к их приготовлению в дистиллированной воде (вместо физ. раствора, обычно используемого для интратрахеальных инстялляций) и, во-вторых, к ультразвуковой обработке сравниваемых суспензий в одном и том же режиме непосредственно перед инстялляцией при четкой организации и сжатом времени проведения этой процедуры, – что в совокупности обеспечило нано-размерность даже успевающих образоваться агрегатов. Следует учесть, что та или иная степень агрегации наночастиц имеет место и в аэрозолях, особенно при высокой их концентрации, так что использованная экспериментальная модель не может считаться грубо

искажающей реальную ситуацию ингаляционных экспозиций в условиях воздуха рабочих помещений, а также в условиях экспериментальных ингаляционных камер.

Результаты предварительной оценки стабильности вводимых суспензий и краткость интервала времени между их подготовкой и введением в трахею каждой крысы позволяют предположить, что такая агрегация могла иметь место, главным образом, уже после инстялляции и отложения частиц в легких, но до их попадания внутрь клетки. Между тем, этот процесс агрегации допустимо рассматривать не столько как артефакт, сколько в качестве экспериментальной модели реального процесса. Действительно, учитывая высокую склонность наночастиц к агрегации, можно полагать, что она имеет место и после их отложения на жидкую выстилку легочного ацинуса, даже несмотря на стабилизирующую роль легочного фосфолипидного сурфактанта, тем более что в случае магнетита этой агрегации способствует высокая намагниченность наночастиц.

Так или иначе, но если не была увидена и потому недосчитана какая-то доля самых мелких внутриклеточных частиц (10-нанометровых), то тем более значим тот факт, что именно их было обнаружено больше, чем частиц других размеров, и в макрофагах, и в нейтрофилах. В подтверждение этого следует, в дополнение к показанным на диаграммах укрупненным результатам дифференциального подсчета клеток с разным содержанием фагоцитированных частиц, сопоставить данные по фракции клеток, содержащих количество частиц, не поддающееся подсчету. Такие клетки составляли в нейтрофильном пуле 57,6 % при инстялляции частиц 10 нм, 27,5 % при инстялляции частиц 50 нм и только 2,4 % при введении частиц 1 мкм, а в макрофагальном пуле – 64,8 %, 52,8 % и 2,2 %, соответственно.

Эту особую «жадность» фагоцитов к наночастицам, в особенности, мельчайшим, можно предположительно связать с повышенной способностью последних к пиноцитозу, однако существует еще одно объяснение рассматриваемого феномена. Ранее было показано, что продукты разрушения

макрофага обладают не только свойствами аттрактанта для обоих типов фагоцитирующих клеток, но и многосторонним активирующим влиянием, по крайней мере, на макрофаг, усиливая, в частности, как миграционную, так и фагоцитарную активность этой клетки (Katsnelson B.A. et al., 1994; Привалова Л.И., 1990). Поскольку же, судя, по сравнительной оценке, отношения НЛ/АМ, цитотоксичность испытанных частиц магнетита убывает в том же порядке (см. выше), что и зафиксированная на 24 часа фагоцитарная активность, можно думать, что такая ранговая корреляция связана с образованием наибольшего количества указанных продуктов разрушения макрофагов при действии наиболее 10-нанометровых наименьшего при действии цитотоксичных И 1микрометровых частиц. Следовательно, в случае введения первых имеет место наибольшая, а при введении последних – наименьшая активация фагоцитов, еще сохранивших жизнеспособность, продуктами разрушения погибших от действия соответствующих частиц.

В Таблице 3.1.4 приведены результаты сравнительной оценки сдвигов клеточного состава БАЛЖ в ответ на интратрахеальное введение НЧ золота (Au) 50 нм, а также НЧ 49 нм или микрочастиц (MЧ) серебра (Ag) 1,1 мкм для сопоставления с результатами аналогичного эксперимента с более мелкими наночастицами тех же металлов (Au 3,8 нм, Ag 3,6 нм). Эти два эксперимента проводились не параллельно, в разные периоды (2011 и 2012 гг.) и, что особенно важно – при разном фоновом уровне клеточности БАЛЖ (как видно из Таблицы 3.1.4, во втором эксперименте все ее показатели у контрольных крыс были выше, чем в первом).
Таблица 3.1.4 – Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,5 мг частиц разных металлов в 1 мл воды, $(\overline{X \pm S_x})$

Врадациоа		OTHOMAUNA			
Веденное	Общее число	Нейтрофиль-ных	Альвеолярных		
вещество	клеток	слеток лейкоцитов (НЛ) макрофагов (AM)		11J1/AW	
	Сравнение	3,8 нм Аи и 3,6 нм А	.g в дозе 0,2 мг		
НЧ Ag	2,78±0,58*	2,13±0,52*	0,64±0,07	3,17±0,49*	
НЧ Au	2,37±0,49*	1,45±0,22*	0.93±0,14	1,67±0,20*•	
Вода (контроль)	0,99±017	0,06±0,01 0,93±0,17		0,05±0,01	
(Сравнение 50 нм	Аи и 49 нм или 1,1 м	икм Ag в дозе 0,5 мг		
НЧ Ag	4,25±0,77°	2,99±0,71*°	1,16±0,14	2,47±0,33*°	
MЧ Ag	1,99±0,25	0,73±0,15*	1,24±0,19	0,66±0,13*	
НЧ Au	2.30±0.93•	0,63±0,15*•	0,94±0,09	0,63±0,13*•	
Вода (контроль)	1,41±0.33	0,13±0,04	0,89±0,18	0,14±0,023	

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «НЧ Ag»; • – между группами «НЧ Ag» и «МЧ Ag» (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

Нельзя не обратить внимание на то, что, несмотря на существенно менее высокое контрольное (фоновое) значение показателя НЛ/АМ в эксперименте с более мелкими НЧ Ag и НЧ Au, чем в эксперименте с более крупными наночастицами, для обоих нанометаллов он в первом случае был заметно выше.

Таким образом, при параллельном интратрахеальном введении равноразмерных НЧ Ag и НЧ Au, НЧ Au вызывали выраженное, хотя и статистически недостаточно значимое, повышение общей клеточности БАЛЖ и числа AM при статистически значимом 5-кратном увеличении числа НЛ. Однако НЧ Ag вызывали значительно более активную реакцию по всем показателям, причем по отношению НЛ/AM различие реакций на НЧ Au и НЧ Ag статистически значимо, свидетельствуя о том, что наносеребро существенно более цитотоксично, чем нанозолото.

В следующем эксперименте сравнивалось цитотоксическое действие меднооксидных частиц размером 20 нм и 340 нм. Учитывая, что условной границей нанометрового диапазона является 100 нм, то частицы Cu₂O размером 340 нм далее обозначены как микрочастицы МЧ, хотя на самом деле они

являются субмикронными. Как видно из Таблицы 3.1.5, при действии медьсодержащих НЧ реакция альвеолярного фагоцитоза была выражена в значительно большей степени, чем при действии МЧ.

Таблица 3.1.5 – Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,5 мг медьсодержащих частиц разных размеров в 1 мл воды, $(\overline{X} \pm S_x)$

Введенное		Отношение		
вещество	Общее число Нейтрофиль-		Альвеолярных	НЛ/АМ
	клеток	ных лейкоцитов	макрофагов	
		(НЛ)	(AM)	
НЧ 20 нм	11,87±1,84*°	9,41±2,011*°	2,7±0,71*	4,66± 1,91*
МЧ 340 нм	6,79±1,28*	3,64±0,896*	3,06±0,86*	1,39±0,16*
Вода (контроль)	$1,06\pm 0,14$	0,052±0,01	0,95±0,183	0,058±0,01

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; $^{\circ}$ – между группами «НЧ 20 нм» и «МЧ 340 нм» (при p<0,05 по t-критерию Стьюдента).

Сравнение действия нано- и микрочастиц подтверждает, что при одной и той же химической природе нано- и микрочастиц последние гораздо менее цитотоксичны и поэтому вызывают менее интенсивную мобилизацию НЛ. Вместе с тем, как показывает наш опыт, число АМ в БАЛЖ (отражающие противоположно направленные эффекты их мобилизации и разрушения) при действии более цитотоксичных частиц нередко бывает меньшим, чем при действии менее цитотоксичных; именно это соотношение имеет место при сравнении нано- и микрочастиц. В других случаях мобилизация новых АМ (которая так же, как и мобилизация НЛ, управляется количеством образующихся продуктов макрофагального разрушения, но при ином типе математической зависимости между их дозой и числом мобилизуемых клеток (Privalova L.I. et al., 1980; 1987; 1995) превалирует над их разрушением, так что число АМ оказывается более высоким при действии более цитотоксичных частиц.

Рассматриваемая здесь мобилизация нейтрофильных лейкоцитов в направлении свободной поверхности глубоких дыхательных путей в связи с осаждением на ней тех или иных частиц довольно часто описываются как «воспаление», то есть как патологические явление. Такая трактовка является обычной и для авторов нано-токсикологических исследований (Renwick L. et al., 2004; Sager T.M. et al., 2007; Warheit D.B. et al. 2009), однако она может ввести в заблуждение.

Вне всяких сомнений, эта мобилизация типична для острых и, в меньшей степени, хронических респираторных воспалений микробной или химической этиологии. Однако определенное число НЛ всегда присутствует в БАЛЖ даже молодых крыс, постоянно дышащих не отфильтрованным окружающим воздухом, считать которых больными хроническим воспалением легких нет серьезных оснований. С другой стороны (Privalova L.I. et al., 1980; Katsnelson B.A. et al., 1984; Privalova L.I. et al., 1987) уже давно были представлены в экспериментах и при математическом моделировании убедительные доказательства того, что усиление мобилизации НЛ является важным механизмом частичной компенсации повреждения, нанесенного цитотоксичными микрочастицами основному, а именно макрофагальному механизму их легочного клиренса.

Наши эксперименты подтвердили, что сказанное еще более справедливо для частиц нанодиапазона, и что усиленный приток НЛ, будь это элемент воспаления или нормальная защитная реакции, играет важнейшую роль в самоочищении легких от НЧ.

Показателем цитотоксического повреждения фагоцитирующих клеток частицами являются также сдвиги некоторых биохимических компонентов БАЛЖ. Судя по литературным данным, в качестве такого биохимического критерия сравнительной цитотоксичности интратрахеально вводимых частиц часто использовалось повышение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в жидкой фазе (супернатанте) БАЛЖ.

Повышение концентрации энзимов в БАЛЖ обычно объясняют их релизом в результате повреждения макрофага, а также эпителиальных клеток.

Как видно из данных, приведенных в Таблице 3.1.6, наблюдалось повышение активности амилазы, щелочной фосфатазы, и глютамилтрансферазы, которое может получить аналогичное объяснение. Однако, как видно из той же Таблицы, статистически значимое отличие от контрольных величин при

75

воздействии медьсодержащих НЧ наблюдалось также по ряду других показателей, в то время как при воздействии МЧ соответствующие сдвиги либо отсутствовали, либо были менее выражены (как правило, при достаточной статистической значимости межгрупповых различий).

Помимо рассмотренного выше цитотоксического действия, причиной всех этих сдвигов, вероятно, могут быть вызываемые медью, в том числе, переходящей в раствор в ионной форме, острые воспалительные изменения легочной ткани и повышение проницаемости сосудов.

Таблица 3.1.6 — Некоторые биохимические характеристики жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,5 мг медьсодержащих частиц в 1 мл воды, $(\overline{X} \pm S_x)$

	Введенное вещество:				
	Вода				
Показатели	(контроль)	НЧ 20 нм	МЧ 340 нм		
Глюкоза, ммоль/л	$0,56\pm0,00$	1,36±0,25*•	0,56±0,00		
Азот мочевины, ммоль/л	0,36±0,00	0,68±0,10*•	0,36±0,00		
Мочевая кислота, мкмоль/л	14,67±0,33	16,75±0,50*•	14,25±0,25		
Амилаза. МЕ/л	30,00±0,00	140,25±3,50*•	30,00±0,00		
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	20,33±2,60	29,75±3,77	27,00±1,68		
АлТ. МЕ/л	21,33±0,67	25,25±0,29*•	22,00±0,41		
АсТ. МЕ/л	7,33±1,20	39,75±2,29*•	19,50±1,66*		
Коэф. де Ритиса	0,34±0,05	1,57±0,08*•	0,88±0,07*		
Глютамилтрансфераза. МЕ/л	5,33±0,33	14,50±0,87*	10,25±0,63*		
Лактатдегидрогеназа, МЕ/л	166,67±30,33	821,50±9,50*•	601,75±54,65*		
Кальций, ммоль/л	0,12±0,00	0,25±0,02*•	0,12±0,00		
Магний, ммоль/л	0,12±0,00	0,16±0,01*•	0,12±0,00		
Фосфор, ммоль/л	0,14±0,01	0,25±0,02*•	0,14±0,00		
Железо, мкмоль/л	$0,40\pm0,00$	0,83±0,21*•	$0,40\pm0,00$		
% фагоцитарно активных					
клеток а тесте с золотистым					
стафилококком	43,07±3,88	89,13±2,01*	79,50±8,22*		

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – между группами «НЧ 20 нм» и «МЧ 340 нм» (P<0,05;по t-критерию Стьюдента).

Так или иначе, более высокая биологическая агрессивность испытанных медьсодержащих НЧ по сравнению с субмикронными частицами при однократном интратрахеальном введении продемонстрирована всей

совокупностью данных, представленных в Таблицах 3.1.5 и 3.1.6. Вполне возможно, что причиной этого различия является более высокая растворимость наночастиц. На основании обзора обширной литературы Fröhlich (2013) полагает, что вообще для многих металлов и их оксидов релиз свободных ионов является наночастиц вторым механизмом цитотоксичности **(B** качестве первого рассматривается образование реактивных форм кислорода В результате различных химических реакций).

Таким образом, само по себе предположение о чрезвычайно высокой цитотоксичности наночастиц, которое экспериментально не всегда обнаруживается некоторыми авторами (Warheit D.B. et al., 2007; Karlsson H.L. et al., 2009), подтверждается в рамках проведенных экспериментов, причем не только при сравнительном тестировании разных по размеру частиц одного и того же вещества (магнетита, серебра или оксида меди), но и при таком же сравнении взвеси 10-нанометровых частиц этого вещества с взвесями других минеральных частиц, имеющими размеры частиц в широком диапазоне, характерном для обычных промышленных аэрозолей дезинтеграции. Как видно из Таблицы 3.1.7 и Рисунка 3.1.2, оксид железа, который крайне мало биологически агрессивен как объемное вещество (bulk material) и как микрометровая частица, в нано-состоянии оказался гораздо более агрессивен, судя по показателю НЛ/АМ, по сравнению не только с другим относительно «инертным» веществом, к каким относится микрометровая пыль диоксида титана, но и высоко цитотоксичной кварцитной пылью. Отметим попутно хорошую воспроизводимость оценки цитотоксичности 10-нанометрового магнетита: если в нашем первом эксперимента показатель НЛ/АМ был найден равным 6.39±0,66, то во втором - 5,10±0,65 при статистически не значимой разнице (t Стьюдента = 1,39).

77

Таблица 3.1.7 – Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 2 мг 10-нанометровых частиц магнетита или полилисперсных суспензий TiO_2 и SiO_2 в 1 мл волы. ($\overline{X} \pm S_x$)

Введенное вещество	Ч	Отношение					
	Общее число АМ		НЛ	НЛ/АМ			
	клеток						
Вода	$2,86\pm0,48$	2,30±0,40	0,33±0,06	0,16±0,03			
(контроль)							
Магнетит 10 нм	8,09±2,84	1,31±0,41	6,70±2,48*•	5,10±0,65*•□			
TiO ₂	3,34±1,60	2,34±1,12	0,79±0,40	0,32±0,02*□			
SiO ₂	3,68±1,00	$1,68\pm0,48$	1,8±0,53*	1,12±0,15*•			

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»;

• – с группой «TiO₂»; \Box – с группой «кварцит» (при <u>p</u> \leq 0,05 по t-критерию Стьюдента).



Рисунок 3.1.2 – Отношение числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 2 мг 10-нанометровых частиц магнетита или полидисперсных суспензий TiO₂ и SiO₂ в 1 мл воды.

Сравнительная интенсивность фагоцитарной реакции легких на НЧ заданного диаметра, их отложение и активность поглощения частиц фагоцитами предопределяются и их химической природой.

Зависимость биологической агрессивности от химической природы наночастиц подтверждается и результатами сравнительного эксперимента с НЧ NiO и НЧ Fe₂O₃. Как видно из данных, представленных в Таблице 3.1.8, интратрахеальное введение НЧ NiO вызывает статистически значимое увеличение общей клеточности БАЛЖ, которое связано со значимым увеличением числа нейтрофильных лейкоцитов и в меньшей степени – альвеолярных макрофагов, что отражается достоверным увеличением численного отношения НЛ/АМ. Все эти сдвиги характерны и при действии НЧ Fe₂O₃ однако выражены намного слабее, чем при введении НЧ NiO со статистической значимостью между ними по общему числу клеток в БАЛЖ, притоку НЛ, отношению НЛ/АМ.

Таблица 3.1.8 – Некоторые показатели жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,2 мг различных частиц в 1 мл воды, (X± S_x)

Показатели	Введенное вещество				
	Вода	НЧ NiO	HЧ Fe ₂ O ₃		
	(контроль)				
Общее число клеток, x10 ⁶	1,79±0,19	9,81±1,44*	3,84±0,49*•		
АМ, млн	0,97±0,20	1,76±0,28*	1,61±0,15*°		
НЛ, млн	0,81±0,19	7,84±1,33*	2,18±0,48*•		
Отношение НЛ/АМ	1,17±0,39	6,12±1,89*	1,50±0,37•		
Амилаза в НОЖ, Е/л	4,46±1,6	38,8±8,5*	12,76±4,7●		
ГГТП в НОЖ, Е/л	2,27±0,8	6,26±1,3*	3,5±0,9		
ЛДГ в НОЖ, Е/л	4,8±3,1	79,4±18,9*	25,7±5,8*•		

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «NiO»; (при p<0,05 по t-критерию Стьюдента).

Как видно из результатов биохимического анализа БАЛЖ, приведенных в той же Таблице 3.1.8, наблюдается повышение уровней таких ферментов как лактатдегидрогеназа, амилаза и глютамилтрансфераза. Статистически значимое отличие от контрольных величин при воздействии НЧ NiO наблюдалось по всем трем ферментам, в то время как при воздействии НЧ Fe₂O₃ соответствующие сдвиги либо отсутствовали, либо были менее выражены.

Можно отметить хорошую воспроизводимость оценки цитотоксичности НЧ NiO: в другом аналогичном эксперименте с НЧ того же размера и той же

дозировкой 0,2 мг/мл на 1 животное отмечены подобные сдвиги. Общая клеточность по сравнению с контролем была увеличена в 2,5 раза, нейтрофильные лейкоциты в 6 раз и альвеолярные макрофаги в 2, их отношения в 3,5 раза. Той же направленности и силы были изменения ферментов при биохимическом исследовании БАЛЖ.

Хроническая ингаляция наноаэрозоля NiO со средней концентрацией всего $\approx 0,2$ мг/м³ вызвала аналогичные по знаку и сопоставимые по выраженности изменения клеточного и биохимиического состава БАЛЖ (Таблица 3.1.9). НЧ NiO обладают цитотоксическим действием: по статистически значимому увеличению общего притока фагоцитоспособных клеток, как нейтрофильных лейкоцитов, так и альвеолярных макрофагов, повышению отношения НЛ/АМ. Судя по этому показателю можно отметить нарастание цитотоксического эффекта со временем воздействия – если в первые два срока это отношение по сравнению с контролем было увеличено примерно в 2 раза, то в конце экспозиции – в 7 раз. Произошло увеличение уровня ферментов таких как лактатдегидрогеназы, амилазы и глютамилтрансферазы при воздействии во все сроки.

Наши неоднократные исследования показали, что реакция альвеолярного фагоцитоза на интратрахеально введенные и на ингалируемые частицы имеет одну направленность. При обоих способах поступления наблюдается приток, как макрофагов, нейтрофильных лейкоцитов. альвеолярных так И Поэтому принципиальная реакции ингалируемые и интратрахеально схожесть на введенные частицы (в данном случае, НЧ) подтверждает адекватность интратрахеальной модели.

Таблица 3.1.9 – Некоторые показатели жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной затравке наночастицами NiO в концентрации 0,2 мг/м³, $(\bar{X} \pm S_x)$

	Длительность экспозиции					
	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев	
Показатели	Контроль	НЧ NiO	Контроль	онтроль HЧ NiO		НЧ NiO
Общее число	3,50	21,40	2,94	8,38	3,44	9,63
клеток, х10 ⁶	$\pm 0,66$	±6,01*	±0,53	±0,81*	$\pm 0,46$	±1,15*
AM, x10 ⁶	3,06	13,00	2,78	6,67	3,14	5,89
	$\pm 0,69$	±3,22*	±0,53	±0,66*	±0,39	$\pm 0,70*$
НЛ, x10 ⁶	0,43	8,40	0,27	1,72	0,30	3,74
	±0,18	±3,11*	$\pm 0,08$	±0,26*	$\pm 0,08$	$\pm 0,78*$
Отношение	0,26	0,61	0,11	0,26	0,09	0,65
НЛ/АМ	±0,18	±0,11	$\pm 0,04$	±0,04*	$\pm 0,02$	±0,12*
	2.04 ± 0.41	$16,64 \pm$	5 11 + 1 25	15,72	2.02 ± 0.45 X	9,66 ±
Амилаза, Е/л	$2,94 \pm 0,41$	2,65 *	$5,11 \pm 1,55$	± 2,44 *	$2,03 \pm 0,43$	2,49 *
	1.04 ± 0.24	21,76 ±	2.06 ± 1.49	16,56	2.17 ± 0.71	$13,61 \pm$
ГГТП, Е/л	$1,04 \pm 0,34$	2,52 *	$5,90 \pm 1,48$	± 1,34 *	$2,17 \pm 0,71$	2,87 *
	14.2 ± 2.0	$218,33 \pm$	16,3	360,3	10.00 ± 5.7	$256,00 \pm$
ЛДГ, Е/л	$14,3 \pm 2,9$	31,9 *	± 1,1	± 54,6 *	$19,00 \pm 3,7$	5,7*

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

Дополнительное подтверждение того, что сравнительная интенсивность фагоцитарной реакции легких на НЧ заданного диаметра, их отложение и активность поглощения частиц фагоцитами предопределяются и их химической природой, можно найти при рассмотрении результатов, представленных в Таблицах 3.1.10 и 3.1.11, в которых отражены сдвиги клеточного состава БАЛЖ в ответ на ингаляции НЧ Fe_2O_3 и НЧ NiO при концентрациях 1 мг/м³, близком размере наночастиц (НЧ Fe_2O_3 14±4 нм, НЧ NiO 23±5 нм) и одинаковом режиме экспозиции (4 часа в день). Хоть эти два эксперимента проводились не параллельно, в разные периоды и с разными сроками воздействия, нельзя не обратить внимание на то, что интенсивность реакции альвеолярного фагоцитоза на ингаляцию НЧ NiO в разы выше, чем на ингаляцию НЧ Fe_2O_3 (сопоставляя с соответствующими контрольными величинами) и через 3 недели после окончания экспозиции по некоторым показателям сохраняет статистическую значимость (Таблица 3.1.11).

А именно, через 24 часа после окончания экспозиции НЧ NiO интенсивность притока клеточных элементов была значима по всем трем показателям, с 28-кратным увеличением отношения HЛ/AM, через 7 суток это отношение уже не отличалось от контроля, хотя наблюдался увеличенный приток общей клеточности за счет мобилизации альвеолярных макрофагов, который сохранялся и через 3 недели, однако значимо сниженный по сравнению с 7 дневным сроком исследования, но все еще выше контрольного уровня. Причем через сутки после окончания ингаляции HЧ NiO в мазках клеточного осадка БАЛЖ отмечались наличие эозинофилов в 100 % случаев, через 7 дней - в 50 % и через 3 недели - у 20 %. При анализе мазков НЧ NiO после экспозиции при концентрации 0,2 m/m^3 эозинофилы наблюдали лишь в единичных случаях. В мазках БАЛЖ ни после ингаляционной экспозиции или интратрахеального введения HЧ Fe₂O₃ эозинофилы не находили.

Таблица 3.1.10 – Число клеток в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже у крыс через 24 часа после завершающей ингаляционной экспозиции к наноаэрозолю оксида железа Fe_2O_3 , $(\overline{X} \pm S_x)$

		число клеток x10 ⁶			НЛ/АМ
Общая продолжительность экспозиционного периода	Группы животных	Общее число клеток	Нейтрофильных лейкоцитов (НЛ)	Альвеолярных макрофагов (АМ)	
3 месяца	Контроль	1,47±	0,11±	1,35±	0,08±
		0,23	0,03	0,21	0,02
	HЧ Fe ₂ O ₃	2,45±	0,46±	1,96±	0,25±
		0,33*	0,08*	0,28	0,02*

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

Время после экспозиции	Группы животных	Общее число клеток	Нейтрофильн ых лейкоцитов (НЛ)	Альвеолярных макрофагов (АМ)	НЛ/АМ
24 часа	Контроль	$1,05 \pm$	$0,08 \pm$	$0,97 \pm$	$0,10 \pm 0,04$
		0,14	0,04	0,13	
	НЧ NiO	$12,45 \pm$	$8,82 \pm$	$3,63 \pm$	$2,81 \pm$
		1,53*	1,06*	0,64*	0,34*
7 суток	Контроль	1,72 ±	0,66 ±	1,06 ±	$0,67 \pm 0,39$
		0,34	0,32	0,15	
	НЧ NiO	6,39 ±	$1,37 \pm$	5,02 ±	$0,29 \pm 0,05$
		0,68*	0,19	0,61*	
3 недели	Контроль	1,86 ±	$0,37 \pm$	$1,50 \pm$	$0,29 \pm 0,14$
		0,13	0,17	0,14	
	НЧ NiO	$3,25 \pm 0,24*$	0,33 ±	2,92 ±	$0,12 \pm 0,03$
			0,07	0,27*	

Таблица 3.1.11 – Сдвиги клеточного состава бронхо-альвеолярной жидкости крыс после ингаляции наночастиц оксида никеля 1 мг/м³, $(X \pm S_x)$

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль»; (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

3.2. Изучение топографии поверхности фагоцитирующих клеток

Оценка топографических изменений поверхности клетки проводилась с помощью полуконтактной атомно-силовой микроскопии (пк-ACM), известной уникальными возможностями трехмерной визуализации поверхностной топографии биологических объектов с нанометровым пространственным разрешением (Zhang P.C. et al., 1995; Zaitsev B.N. et al., 2002). Как известно, начальный момент поглощения частицы фагоцитоспособной клеткой является поверхностный контакт между ними, в результате которого часть клеточной (плазматической) мембраны инвагинируется и как бы отщипывается, образуя ограниченную мембраной вакуоль, называемую эндосомой или фагосомой.

Процесс инвагинации изменяет топографию поверхности фагоцита (будь то AM или HЛ) и характер и степень этих изменений в какой-то степени зависят от преобладающего размера фагоцитируемых частиц и от фагоцитарной активности клетки.

Во всех экспериментах пкАСМ выявила многочисленные «ямки» на поверхности как АМ, так и НЛ.

Рисунок 3.2.1 иллюстрирует типичную трехмерную картину поверхности клеток. Как видно, среднее число микро-вдавлений на единицу клеточной поверхности во всех группах клеток БАЛЖ, полученных после инстялляции частиц магнетита, значительно выше, чем в контрольной группе, будучи наибольшим при номинальном размере инстяллированных частиц 10 нм и наименьшим – при 1 мкм.

Хорошее соответствие между данными, полученными при оптической микроскопии частиц, находящихся в фагоцитированном состоянии, и при атомносиловой микроскопии клеточной поверхности, косвенно подтверждает наше предположение, что обнаруживаемые на ней микро-вдавления связаны с инвагинацией плазматической мембраны на первой стадии фагоцитоза частиц.





Рисунок 3.2.1 – Типичная топография поверхности клеток БАЛ при полуконтактной атомно-силовой микроскопии: (а), (б) контрольная группа; (в), (г) после введения магнетита 10 нм; (д), (е) то же 50 нм; (ж), (з) то же 1 мкм.

85



Рисунок 3.2.2 – Среднее число и средняя поверхностная плотность на поверхности на поверхности клеток каждой группы по номинальному размеру введенных частиц магнетита (X ± S_x).



Рисунок 3.2.3 – Гистограммы распределения поверхностных плотностей микровдавлений по диаметру для клеток контрольной группы (а) и групп, получивших частицы магнетита размером 10 нм (б), 50 нам (в) или 1 мкм (г).



Рисунок 3.2.4 – Среднее число (а) и средняя поверхностная плотность (б) микродавлений диаметром >1 мкм на поверхности клеток каждой группы (X± S_x).

Существенные межгрупповые различия по числу микро-вдавлений в зависимости от размера инстяллированных частиц представлены на Рисунке 3.2.3. На Рисунке 3.2.4 показано среднее число микро-вдавлений с диаметрами > 1 мкм на поверхности клеток разных групп крыс. Можно видеть, что после инстялляции мельчайших (10 нм) частиц число таких относительно крупных микро-вдавлений является наименьшим, а после инстялляции наиболее крупных (1 мкм) частиц – наибольшим.

Таким образом, это свидетельство в пользу того, что микро-вдавление есть действительно своего рода след инвагинации в процессе фагоцитоза частицы.

Интересно отметить также, что число таких сравнительно крупных микровдавлений относительно высоко и на поверхности клеток контрольной группы. Вероятно, это отражает довольно высокий процент частиц микрометрового диапазона, отлагающихся в пульмонарной области из того не фильтрованного воздуха, которым дышат крысы.

Этот же феномен образования «вдавлений» наблюдался в экспериментах с НЧ Аg и НЧ Au.

Поскольку в этом случае сравниваемые НЧ были практически одного и того же среднего диаметра около 50 нм, то размеры «вдавлений» оказались не зависящими от химической природы металла. Напротив, плотность этих «вдавлений» на поверхности клетки была для НЧ Аg в 1,5 раза выше, чем для НЧ Au. Таким образом, подтвердилось, что этот показатель (отражающий жадность поглощения частиц клеткой) тем выше, чем выше их цитотоксичность.

Наблюдавшийся факт, что размер «вдавлений» несколько больше размера соответствующей НЧ, легко объясним, поскольку первая является не «пробоиной» в клеточной мембране при прохождении через нее частицы, а результатом ее инвагинации. С другой стороны, постепенное затягивание устья перед его полным отделением ОТ поверхности микровдавления клетки обусловливает тот факт, что на фиксированный момент времени фотографируется значительное число «вдавлений», диаметр которых намного меньше диаметра поглощенной НЧ. И, действительно, если сравнить функции распределения, графически приведенные на Рисунках 3.2.5 и 3.2.6, то можно увидеть, что распределение диаметров «вдавлений» по сравнению с распределением диаметров частиц симметрично растянуто как в сторону более высоких, так и в сторону меньших значений.

Средняя плотность «вдавлений» на единицу поверхности найдена равной 9,07 мкм⁻² для НЧ Аu и 13,14 мкм⁻² для НЧ Аg, то есть в 1,45 раза выше для более цитотоксичного НЧ Аg.



Рисунок 3.2.5 – Функции распределения размеров наночастиц: результат статистической обработки измерения 800 изображений наночастицы золота (а) и 650 изображений наночастицы серебра (б), полученных при сканирующей электронной микроскопии).



Рисунок 3.2.6 – Гистограммы распределения плотности «ямок» (pits) по поперечным размерам, рассчитанные для сканов малой площади (2х2 мкм) для клеток, взаимодействовавших с наночастицами золота (а) или серебра (б)

При интратрахеальном введении частиц оксидов меди средний диаметр «вдавлений» коррелирует со средним диаметром фагоцитируемых частиц, будучи равным 27,5±0,7 нм в случае воздействия образцов НЧ и 290±14 нм в случае воздействия МЧ. Субмикронные частицы меди имеют ядро из металлической меди Си и поверхностный слой, который состоит из оксида меди (I) Cu₂O. Тот факт, что «вдавления» от микрочастиц меди несколько меньше чем вводимые частицы, вероятно, связан с уменьшением исходного среднего диаметра частиц (340 нм) до 175 нм (Рисунок 3.2.7) в результате полного растворения поверхностного слоя оксида меди (I) Cu₂O толщиной 80 нм (340 – 80х2 = 180 нм). Оставшееся ядро металлической меди не растворяется.



Рисунок 3.2.7 – Функция распределения микрочастиц по размерам после 24часовой экспозиции в супернатанте БАЛЖ, полученная анализом СЭМ изображений.

Подтверждается и другая ранее выявленная закономерность: чем выше цитотоксичность частиц (в силу различий их размера и/или химической природы), тем интенсивнее их поглощение фагоцитами, чему соответствует более высокое среднее число ямок на единицу поверхности. В данном случае оно равнялось 32,6 или 74.4 на мкм² при действии НЧ Си₂О и только 1,85 при действии МЧ Си₂О (при подсчете в пределах малых сканов 2x2 мкм, обеспечивающем наибольшее разрешение). Повышение фагоцитарной активности С увеличением цитотоксичности фагоцитируемых частиц, как указано выше, объясняется тем, что продукты макрофагального разрушения активируют жизнеспособную клетку в отношении многих ее функций, в том числе, фагоцитарной, что доказано экспериментами in vitro (Privalova L.I. et al., 1995).



Рисунок 3.2.8 – Топография поверхности альвеолярного макрофага при полуконтактной атомно-силовой микроскопии: (а) – контрольной крысы, (б) – после введения медно-оксидных МЧ 340 нм, (в) – после введения наночастиц 20 нм.

Важно подчеркнуть, что вышеописанный феномен образования «ямок» на поверхности альвеолярного макрофага не является артефактом, связанным с интратрахеальным введением относительно высоких доз наночастиц, поскольку он обнаруживается и при ингаляционной экспозиции к низкой концентрации НЧ оксида железа (Рисунок 3.2.9).



Рисунок 3.2.9 – Трехмерная реконструкция топографии поверхности альвеолярного макрофага в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (а) крысы, ингалировавшей наночастицы Fe₂O₃ и (б) контрольной крысы. Полуконтактная атомно-силовая микроскопия скана 2x2 мкм. Средняя плотность нано-размерных ямок, соответственно, 10,1±4,1 и 2,7±0,9 мкм⁻² (p<0,1)

3.3. Внутриклеточная ультраструктура фагоцитирующих клеток

С помощью электронной микроскопии изучали внутриклеточную локализацию в фагоцитоспособных клетках не только агрегированных, но и единичных НЧ, а также визуализацию тех повреждений этих клеток на ультраструктурном уровне, которые могут быть связаны с воздействием НЧ.

На Рисунке 3.3.1 показана типичная электронно-микроскопическая картина периферии AM от крыс, подвергнутых воздействию НЧ магнетита 10 нм как наиболее жадно фагоцитируемые и, вместе с тем, наиболее цитотоксичные для AM.

Внеклеточно расположенные единичные НЧ или преформированные мельчайшие агрегаты, состоящие из 2-3 первичных НЧ, находятся на близком расстоянии или в прямом контакте с плазматической мембраной. При внутриклеточном их расположении они обнаруживаются внутри вакуолей, отграниченных от цитоплазматического матрикса мембраной. Эти мельчайшие фагосомы образуются, как уже было указано, в результате обособления инвагинированного участка плазматической мембраны клетки. Можно видеть, что одна такая фагосома находится в тесном контакте с внутренним контуром плазматической мембраны, от которой она, очевидно, только что отделилась. Рядом с нею видны НЧ в процессе начинающейся инвагинации.



Рисунок 3.3.1 – Поглощение наночастиц магнетита 10 нм альвеолярным макрофагом. ПЭМ, увеличение x140000

Ни в одном срезе не было обнаружено картин, которые свидетельствовали бы подобным же образом о фагоцитировании преформированных крупных конгломератов микрометрового размера, которые ранее обнаруживались внутри AM при оптической микроскопии с увеличением х1000. Вместе с тем, при электронной микроскопии внутри AM также в немалом числе видны такие конгломераты, причем в большинстве случаев они отграничены двухконтурной мембраной, то есть расположены внутри крупной эндосомы (фагосомы), являющейся результатом фузии более мелких фагосом (Рисунок 3.3.2).



Рисунок 3.3.2 – Наночастицы магнетита 10 нм, аккумулированные в эндосоме ПЭМ, увеличение х8900

В тех же случаях, в которых такой отграничивающей мембраны не видно и конгломерат НЧ располагается свободно в цитоплазме, речь идет, по всей вероятности, о вторичном явлении, связанном с разрушением эндосомальной мембраны в результате повреждающего ее действия НЧ. Наиболее явно это повреждающее действие видно там, где свободно лежащий конгломерат НЧ находится в контакте с мембранами других органелл (в особенности часто, митохондрий, как видно на Рисунок 3.3.3) или с ядерной мембраной, как показано на Рисунке 3.3.4. В митохондриях НЧ магнетита располагаются на мембране и кристах, иногда полностью заполняя матрикс. При этом видно нарушение двухконтурности мембраны, разрушение просветление крист И митохондриального матрикса.



Рисунок 3.3.3 – Контакт кластеров наночастиц магнетита 10 нм с мембранами (стрелка 1) и кристами (стрелка 2) альвеолярного макрофага. ПЭМ, увеличение х22 000

Обращает на себя внимание почти полное отсутствие первичных лизосом, которые легко и в большом числе обнаруживаются в АМ контрольных животных. Возможно, это связано с повреждающим действием НЧ на аппарат Гольджи, ответственный за образование лизосом. Нельзя исключить, однако, что речь идет о результате закономерной фузии этих органелл с многочисленными фагосомами (т.е. об образовании фаголизосом, или так называемых вторичных лизосом). После повреждения фаголизосомальной мембраны освобождение лизосомальных гидролитических ферментов В цитоплазму служит, вероятно, важным дополнительным механизмом повреждения и разрушения клетки. Роль этого «самопереваривания» макрофага при действии микрочастиц давно вошла в круг классических представлений о механизмах цитотоксичности таких частиц, в частности, кварцевых для макрофагов (Кацнельсон Б.А. и др., 1995). Во всяком случае, при электронной микроскопии обнаруживается немало полностью разрушенных АМ с выходом НЧ и их конгломератов в межклеточное пространство.



Рисунок 3.3.4 – Контакт кластера наночастиц магнетита 10 нм с ядерной мембраной и ее повреждение. ПЭМ, увеличение x22 000

Таким образом, имеются достаточные основания полагать, что образование внутриклеточных конгломератов НЧ связано первично не просто с особой их склонностью к физической агрегации, присущей всем НЧ (в особенности, магнитным) в жидкой среде, а с тем же физиологическим процессом на стадии слияния мелких фагосом в более крупные, внутри которых уже и проявляется эта склонность. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что, как и при действии минеральных микрочастиц, первопричиной цитотоксичности НЧ для АМ является мембранолитическая активность.

Изменения ультраструктуры фагоцитирующих клеток обнаруживается и в последующих экспериментах.

Проникновение через цитоплазматическую мембрану происходит с образованием фагосомы, отграниченной тонкой мембраной. В цитоплазме НЧ преимущественно обнаруживаются в фагосомах, как правило, одиночных, не контактирующих ни с какими органеллами. Конгломераты наночастиц в цитоплазме не выявлены ни одной из просмотренных клеток. На все число 72 изученных микрофотографий АМ и НЛ внутри митохондрий обнаружены только

15 частиц, где они локализуются на кристах или на внутренней поверхности митохондриальной мембраны. У таких митохондрий отмечается выраженная деструкция крист, гомогенизация митохондриального матрикса, лишь частичная сохранность двухконтурной мембраны. Даже в клетках, в цитоплазме которых обнаруживаются частицы, непосредственно не взаимодействующие с митохондриями, в последних также видны признаки деструкции, но менее выраженные, чем при проникновении НЧ внутрь органеллы. Лизосомы видны в цитоплазме примерно в том же количестве, что на контрольных препаратах.

НЧ Аи выявляются внутри ядер всех просмотренных клеток. В некоторых случаях частицы проникают в ядро без выраженного изменения ядерной мембраны; В других случаях проникновение частиц сопровождается разрыхлением ядерной мембраны И нарушением ee двухконтурности. Аналогичные изменения ядерной мембраны выявляются и при множественном расположении частиц вблизи ядерной мембраны. Изменений хроматина вокруг НЧ в ядре почти не выявлено, лишь в единичных случаях отмечается его разрежение.

Все вышеизложенное в принципе в равной степени характерно для AM и НЛ.



Рисунок 3.3.5 – Альвеолярный макрофаг. Наночастицы золота равномерно распределены в цитоплазме и ядре (стрелки без номера). Духконтурность мембраны ядра сохранена не на всем протяжении. Видна митохондрия (стрелка 1), не взаимодействующая с наночастицами, но их сохранена фрагментарно. ПЭМ, увеличение х22 000.

НЧ Ад обнаруживаются не в каждой клетке, причем от единичных или умеренного числа, до большого количества. В отличие от НЧ Аи, вблизи цитоплазматической мембраны НЧ Ад не обнаруживается ни внутри, ни снаружи клеток. В основном, они локализуются в глубине цитоплазмы, вероятно, успевая переместиться туда за временной промежуток от контакта с ними клетки in vivo до момента ee фиксации. При сравнении С вышеописанной картиной внутриклеточного распределения НЧ Аи, можно предположить, что в случае НЧ Ад такое перемещение происходило быстрее. Тем не менее, на одном клеточном фрагменте удалось обнаружить агрегат 2-х частиц, по-видимому, только что проникший через цитоплазматическую мембрану с образованием фагосомы. В

фагосомах, располагающихся в глубине клетки, обнаруживаются и одиночные частицы, и их конгломераты, однако невозможно судить, проникли ли последние в клетку в преформированном состоянии или образовались уже внутри сливающихся фагосом. Второй механизм представлялся нам явно наиболее вероятным для 10 нм частиц магнетита, судя по особенностям их распределения внутри АМ.

Наиболее часто выявляются скопления частиц, локализованные внутри митохондрий либо на кристах, либо на внутренней поверхности мембран (Рисунки 3.3.6 и 3.3.7). В некоторых митохондриях скопления настолько крупные, органеллу, но иногда одиночные ЧТО занимают почти всю ΗЧ также митохондрий. У обнаруживаются внутри митохондрий, как тесно взаимодействующих с частицами, так и не свободных от прямого контакта с ними, выявляются признаки деструкции: сохранены лишь единичные кристы или видны только их фрагменты, отмечается гомогенизация митохондриального матрикса; двухконтурная мембрана сохранена фрагментарно или не видна совсем. Лизосомы видны в цитоплазме примерно в том же количестве, что на контрольных препаратах.

Во всех просмотренных клетках не выявлено НЧ Ад, находящихся внутри ядра. Лишь в одном случае, вблизи ядра видно крупное скопление частиц, И расположенное В фагосоме, просматривается одна мелкая частица, проникающая через ядерную мембрану без нарушения целостности последней. Вблизи ядра обнаруживаются и единичные частицы. Изменения ядерной мембраны при этом неоднородны. Отмечается разрыхление ядерной мембраны и нарушение ее двухконтурности на участке вблизи крупной одиночной частицы, но вместе с тем, вблизи небольшого скопления, состоящего из некрупных частиц, ядерная мембрана четкая, двухконтурность хорошо просматривается.

Разницы в локализации НЧ Аи и Ад внутри АМ и НЛ не выявлено.

Таким образом, основные различия электронно-микроскопической картины легочных фагоцитов при воздействии частиц НЧ Аg и НЧ Au сводятся к следующему:

НЧ Au чаще видны как единичные и относительно равномерно распределенными, а частицы НЧ Ag более склонны к образованию конгломератов. Частицы НЧ Ag, в отличие от НЧ Au, почти не видны внутри клеточных ядер. Частицы НЧ Ag проявляют больший, чем частицы НЧ Au, тропизм к митохондриям, накапливаясь в них в большем количестве и вызывая более выраженную деструкцию мембраны и крист.



Рисунок 3.3.6 – Альвеолярный макрофаг. Проникновение наночастиц серебра из скоплений в цитоплазме в митохондрии. В ядре наночастицы серебра не обнаружены. ПЭМ, увеличение x28 000.



Рис. 3.3.7 – Альвеолярный макрофаг. Видны наночастицы серебра (одиночные и в скоплениях) на внутренней поверхности митохондриальной мембраны.
Отмечается деструкция крист, гомогенизация митохондриального матрикса, мембраны митохондрий сохранены частично. В ядре частицы серебра не обнаружены. ПЭМ, увеличение х36 000.

При ПЭМ клеток БАЛЖ от крыс, получивших микрометровое серебро, почти не обнаруживались такие осмиофильные образования, которые соответствовали бы МЧ Ад. Поскольку введенные интратрахеально МЧ Ад отчетливо видны внутриклеточно при оптической микроскопии, можно предположить, что они как бы «теряются из виду» при чрезмерно большом увеличении электронного микроскопа.

Как НЧ, так и МЧ оксида меди обнаруживаются при просвечивающей электронной микроскопии внутри АМ и НЛ и вызывают выраженные ультраструктурные повреждения клетки (в особенности, митохондрий, а также клеточной и ядерной мембран), что наблюдается даже при обнаружении в ней очень небольшого числа НЧ или МЧ (Рисунок 3.3.8).



Рисунок 3.3.8 – Одиночная наночастица вблизи ядерной мембраны альвеолярного макрофага. Отмечается нечеткость мембраны, нарушение ее двухконтурности в зоне локализации частицы. У митохондрии около частицы отмечается отсутствие крист и просветление митохондриального матрикса, оставшиеся кристы с признаками деструкции, мембраны, нечеткая, прерывистая, двухконтурность просматриваеится не на всех участках. Наночастица внутри разрушенной митохондрии. ПЭМ, увеличение x22000

Интересно сопоставить электронно-микроскопические картины при действии НЧ различных металлов и/или оксидов. Можно отметить, что изменения, вызванные частицами магнетита, по некоторым особенностям (склонность к образованию конгломератов частиц И К накоплению В митохондриях с выраженным повреждением последних, отсутствие видимых наночастиц внутри ядра) ближе к изменениям, вызванным действием НЧ Аg, чем действием НЧ Au. Вместе с тем, при действии НЧ Fe₃O₄ были четко видны образы инвагинации клеточной мембраны с образованием мельчайших фагосом, большое число которых (как и свободно лежащих наночастиц) располагается по периферии клетки, а при контакте конгломератов НЧ с ядерной мембраной отчетливо определялась ее деструкция. Обращало на себя внимание также отсутствие лизосом (чего не наблюдается при действии ни НЧ Ag, ни НЧ Au). Однако трудно сказать, связаны ли эти различия с неодинаковыми свойствами сравниваемых

металлов или с тем, что ранее исследованные НЧ магнетита были значительно мельче (10 нм) по сравнению с исследованными НЧ Аg и НЧ Au.

Внутри фагоцитоспособных клеток в БАЛЖ крыс НЧ обнаруживаются не только после интратрахеальных инстялляций, но и после низкоуровневых хронических ингаляционных экспозиций. Альвеолярные макрофаги в БАЛЖ крыс, подвергавшихся ингаляционному воздействию наночастиц NiO в концентрации 0,23 мг/м³ содержат большое количество НЧ в цитоплазме во всех сроках, а к третьему сроку частицы обнаруживаются и в ядре (Рисунок 3.3.9).



Рисунок 3.3.9 – Альвеолярный макрофаг из жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс, подвергавшихся ингаляционному воздействию наночастиц NiO в концентрации 0,23 мг/м³ в течение 3 месяцев. ПЭМ, увеличение x18590

По всей вероятности, как внутриклеточное распределение металлических наночастиц в фагоцитоспособных клетках, так и ультраструктурные изменения последних варьируют в зависимости как от химической природы металла, так и от размера частиц.

Резюме

НЧ фагоцитируются как альвеолярными макрофагами, так и нейтрофильными лейкоцитами значительно эффективнее, чем микрочастицы того же вещества.

При этом НЧ обладают повышенной цитотоксичностью для альвеолярных макрофагов, которая, судя по увеличению отношения НЛ/АМ, тем выше, чем мельче НЧ. При сравнительной оценке цитотоксичности 10-нанометровых частиц магнетита и полидисперсных суспензий TiO₂ и SiO₂ получено, что магнетит в нанометровом диапазоне более агрессивен даже по сравнению с высоко цитотоксичной кварцевой пылью.

Внутри как AM, так и HЛ имеется большое число наночастиц, причем данные полуконтактной атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии свидетельствуют о том, что в этом проникновении наночастиц внутрь клетки важную роль играет процесс активного фагоцитоза (эндоцитоз).

При сравнении равноразмерных наночастиц цитотоксичность зависит от их химической природы, о чем говорят обнаруженные различия распределения наночастиц различных металлов внутри как АМ, так и НЛ.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СУБХРОНИЧЕСКОГО ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ ЧАСТИЦ ОТ ИХ РАЗМЕРА И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

Для того чтобы выявить те различия системной токсичности, которые связаны именно со специфичными для наноразмерных частиц токсикокинетическими механизмами: активным растворением и резорбцией из первичного места отложения, переносом кровью не только растворенного материала, но и нативных наночастиц в отдаленные органы, вторичной задержкой мигрировавших наночастиц в этих органах (прежде всего, в богатых клетками РЭС) и возможным растворением их в этих вторичных депо, – была необходима такая экспериментальная модель, в которой доза материала в первичном депо является строго заданной и равной для сравниваемых веществ.

C этих позиций, наиболее адекватной экспериментальной моделью субхронической токсической экспозиции к сопоставляемым наночастицам являются повторные внутрибрюшинные инъекции их суспензий в сублетальных дозах на протяжении периода, достаточно длительного в масштабах жизни крысы. Разумеется, следует иметь в виду, что наряду с указанными преимуществами этой модели, она имеет тот недостаток, что барьеры, через которые частицы пенетрируют в кровь из легких и из брюшной полости, анатомически и функционально различны. Однако можно допустить, ЧТО решения для экспериментальных задач сравнительного характера **(**B частности, ДЛЯ сравнительной оценки способности частиц разного размера или химической природы к такой пенетрации и миграции в отдаленные органы) указанное различие не создает существенного искажения.

Отметим, что внутрибрюшинное введение использовалось для изучения

резорбтивной токсичности некоторых наночастиц и другими авторами. Так, Sadauskas E. et al. (2007) исследовали распределение 40-нанометрового золота в первых 24 организме мышей В течение часов после однократного внутрибрюшинного введения и нашли, что оно может быть обнаружено только в макрофагах (причем преимущественно в Купферовских клетках печени). В другом исследовании 12,5-нанометровое золото вводили также мышам внутрибрюшинно ежедневно в разных дозах на протяжении 8 дней, после чего оно было обнаружено в дозо-зависимых количествах во всех исследованных органах, но без каких-либо признаков токсического действия (Lasagna-Reeves C. et al., 2010).

Вместе с тем, при любом пути введения тех или иных наночастиц с целью изучения их системной токсичности и био-аккумуляции: внутрибрюшинном (Lasagna-Reeves C. et al., 2010; Sadauskas E. et al., 2007), внутривенном (Yokel R.A., 2009; Lasagna-Reeves C. et al., 2010), внутрижелудочном (Chen Z. et al., 2006; Wang B. et al., 2006; Reis C.P. et al., 2008; Pokharkar V. et al., 2009; Bu Q. et al., 2010) или ингаляционном (Yu L.E.et al., 2007; Ho J.J.et al., 2007; Gillespie P.A. et al., 2010), – речь обычно идет об однократном воздействии (острая токсичность) или о повторных воздействиях на протяжении от нескольких дней до, значительно реже, 2-4 недель (подострая токсичность), причем 4-недельная экспозиция имела место лишь в двух из приведенных здесь исследований (Ho J.J. et al., 2007; Pokharkar V. et al., 2009).

По-видимому, подобное изучение только *кратковременной* токсичности необходимо и достаточно в тех случаях, когда исследователя интересует прежде всего оценка опасности лечебного или диагностического применения конкретного наноматериала для пациента. Тогда же, когда ставится задача изучения тех или иных общих закономерностей развития неблагоприятных эффектов возможного хронического воздействия наночастиц (прежде всего, в условиях контаминации ими среды обитания), то независимо от соображений, обусловивших выбор той или иной экспериментальной модели хронической или субхронической интоксикации, продолжительность экспозиции желательно продлить настолько,

насколько это возможно без причинения заметного вреда животному самими повторными манипуляциями (само собой разумеется, при параллельном контроле на эффект этих манипуляций). В отношении повторных внутрибрюшинных инъекций наш многолетний опыт показывает, что при частоте до 3 раз в неделю они вполне могут проводиться в течение 5-7 недель, если только речь не идет о введении веществ, обладающих выраженным местным повреждающим действием на брюшину с развитием воспаления и спаечного процесса.

4.1. Сравнительная оценка токсичности частиц разных размеров

Для оценки значения наноразмерности частиц как таковой были проведены субхронические эксперименты при параллельном сопоставлении частиц разного размера. Все эксперименты осуществлялись при повторных внутрибрюшинны введениях по 3 раза в неделю на протяжении 6 недель.

4.1.1. Оценка токсического действия частиц магнетита трех размеров

На 4 группах животных изучали субхроническое токсическое действие частиц магнетита (Fe₃O₄) в разовой вводимой дозе 500 мг/кг. Суспензии каждого размера НЧ Fe₃O₄ вводили внутрибрюшинно по 3 раза в неделю в течение 6 недель. Первая группа животных подвергалась введению суспензии частиц магнетита исходным размером 10 нм; вторая – введению суспензии частиц магнетита размером 50 нм; третья – введению суспензии частиц магнетита размером 1000 нм (то есть 1 мкм); четвертая, служащая контролем, – введению деионизированной воды, полученной с помощью установки УВОИ-«М-Ф» (Россия) и служащей в качестве дисперсионной среды (носителя) суспензий.
Как видно из Таблицы 4.1.1, по большинству показателей частицы магнетита размером 10 нм и 50 нм вызывают более существенные отрицательные сдвиги по отношению к контрольным величинам тех или иных показателей, чем частицы 1 мкм, причем при затравке магнетитом 10 нм они, как правило, выражены наиболее значительно. Исключение составляют содержание железа в сыворотке крови, суточный диурез, креатинин в моче, масса печени и масса селезенки, по которым лидирует группа «50 нм».

Большинство сдвигов носит скорее всего *неспецифический* характер, отражая многостороннее нарушение гомеостаза на организменном уровне – то, что выдающийся российский токсиколог и фармаколог Н.В.Лазарев назвал *интегральными* показателями интоксикации. Из показателей, приведенных в Таблице 4.1.1, наиболее характерны в этом отношение снижение поведенческой «исследовательской» активности (числа заглядываний в норку), снижение содержания белка в сыворотке крови, усиление перекисного окисления липидов (судя по концентрации МДА в ней) и особенно подавление активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови.

В то же время, реакция со стороны красной крови может быть предположительно связана со *специфической* ролью железа в кроветворении. Резкое повышение числа ретикулоцитов свидетельствует о стимуляции эритропоэза, которая в случае воздействия 10-нанометровых частиц, по-видимому, достигает степени, проявляющейся значимым повышением общего числа эритроцитов и содержания гемоглобина.

Однако это, казалось бы, благоприятное действие нано-железа на красную кровь не является достаточным основанием для того, чтобы не учитывать его в качестве одного из критериев потенциального риска хронической экспозиции к этому материалу для здоровья экспонированных лиц.

Во-первых, любое чужеродное воздействие на организм можно рассматривать как допустимое только в том случае, если оно не дает *никакого* биологически значимого эффекта, тем более что благоприятный характер этого эффекта, вполне возможно, сменится на противоположный при удлинении

109

периода экспозиции и/или при увеличении дозы. Отметим, что в предварительных тестах однократное введение магнетита 10 нм в дозе 1000 мг/кг вызвало статистически значимое снижение содержания гемоглобина в крови по сравнению с контрольным.

Во-вторых, рассматриваемый квази-благоприятный эффект развился на фоне других, несомненно неблагоприятных, к которым относятся не только некоторые сдвиги показателей, приведенных в Таблице 4.1.1 (уже упомянутые торможение естественного «исследовательского» поведения, снижение содержания белка в сыворотке крови, в основном, за счет глобулинов, подавление лимфоцитов и усиление перекисного окисления липидов, а также СЛГ нейтрофильный лейкоцитоз, сдвиги активности некоторых ферментов сыворотки, повышенная экскреция креатинина с мочой при повышенном диурезе, увеличение массы печени и селезенки), но и безусловно патологические изменения гистологической картины печени и селезенки, рассматриваемые ниже. Не перечисляется в этом списке безусловно отрицательные сдвиги повышения почечной экскреции дельта-АЛК и копропорфирина, поскольку нельзя исключить, что оно отражает усиленное образование побочных продуктов стимулированного синтеза гема. Однако вполне возможно, что и эти эффекты, наблюдаемые при многих патологических процессах, в особенности, печеночных, и в данном случае связаны с нарушениями порфиринового метаболизма.

Таблица 4.1.1. – Некоторые показатели состояния организма крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц магнетита разного размера в дозе 500 мг/кг, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Показатель	Группы крыс, получавшие			
	Воду (контроль)	Магнетит		
		10 нм	50 нм	1 мкм
Масса тела исходная, г	184,23	184,62	186,15	185,38
	±1,11	±1,55	±1,15	±1,32
Масса тела после затравки,	215,42	213,46	218,46	219,6
Г	±3,96	±2,85	±2,91	±4,5
	17,27	16,82	17,53	17,91
	±1,01	±0,84	$\pm 0,85$	$\pm 0,88$
Норковый рефлекс, кол-во	7,67	4,08	4,45	4,0
загляд. в норки за 3 мин	±1,07	±0,86*	±0,87*	±0,6*

110

Показатель	Группы крыс, получавшие			
	Воду (контроль)	Магнетит		
		10 нм	50 нм	1 мкм
Гемоглобин в крови, г/л	130,13 ±2,94	140,70 ±4,13■	134,1 ±3,7	126,74 ±3,29
Эритроциты, 10 ¹² г/л	5,37 ±0,12	5,76 ±0,14*	5,52 ±0,12	5,45 ±0,12
Ретикулоциты ‰	11,3 ±0,7	53,62 ±1,91*•■	36,73 ±1,21*	14,72 ±1,24*●
Число тромбоцитов тромбоцитов в 1 мкл крови	567,14 ±13,94	547,0 ±36,3	565,71 ±7,48	563,6 ±15,7
Активность СДГ, число	764,7	692,73	703,5	762,30
гранул в 50 лимфоцитов	±15,2	±8,7*■	±8,6*	±10,95•
Лимфоциты, %	$54,42 \\ \pm 2,02$	44,08 ±1,68*■	$43,5 \pm 3,1*$	$51,0 \pm 2,4$
Сегментоядерные	28,92	41,23	40,85	30,67
нейтрофилы, %	±2,07	±1,81*■	±2,71*	±3,15•
Моноциты,%	8,75 ±0,73	8,31 ±1,15	7,85 ±0,91	9,25 ±1,19
Эозинофилы, %	6,42 ±1,14	4,69 ±1,03	5,15 ±0,90	3,7 ±0,7
Базофилы, %	$1,08 \pm 0,47$	0,31 ±0,13	0,54 ±0,14	0,58 ±0,19
Палочкоядерные, %	1,08 ±0,19	1,38 ±0,18	1,92 ±0,26*	1,42 ±0,19
Общий белок в сыворотке	78,23	60,64	65,69	76,73
крови, г/л	±1,56	±2,03*■	±2,13*	±1,79•
Альбумины в	44,09	41,22	36,91	38,94
сыворотке крови, г/л	±1,39	±2,18	±1,78*	±1,33*
Глобулины в	34,14	19,42	28,79	37,8
сыворотке крови, г/л	±1,30	±1,47* • ■	±2,21	±1,8•
Альбумин/	0,79	0,50	0,82	0,99
глобулиновый индекс	±0,05	±0,06***	±0,09	±0,07*
Щелочная фосфатаза в сыворотке крови, нмоль/(с*л)	928,18 ±127,05	1244,9 ±213,4■	1144,67 ±143,90	700,51 ±76,92●
Активность ү- глутаминтрансферазы в сыворотке крови, нмоль/(с*л)	1889,12 ±126,90	2408,76 ±118,46*■	2294,48 ±131,39*	1982,77 ±71,1
Билирубин в сыворотке крови, мкмоль/л	$3,32 \pm 0,83$	$1,79 \pm 0,43$	3,27 ±0,78	$2,69 \pm 0,53$

Показатель	Группы крыс, получавшие			
	Воду (контроль)	Магнетит		
		10 нм	50 нм	1 мкм
Активность АЛТ в	0,99	0,82	0,99	0,85
сыворотке крови, мМ/ч*л	±0,05	±0,07*	±0,06	±0,07
Активность АСТ в	1,25	1,31	1,29	1,13
сыворотке крови, мМ/ч*л	±0,04	±0,04 ■	±0,04	±0,04*•
Kaaddauuuaum na Dumuaa	1,29	1,70	1,33	1,4
Коэффициент де Ритиса	0,07	±0,14*	±0,07	±0,1
Железо в сыворотке крови,	77,15	168,14	262,8	91,98
мг/л	±7,24	±26,41*•	±23,9*	±13,38•
МДА в сыворотке крови	4,39	6,01	6,3	4,42
нмоль/л	±0,11	±0,36*■	±0,3*	±0,11•
Каталаза в сыворотке	0,41	0,32	0,38	0,34
крови, мкмоль/л	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	±0,06	$\pm 0,05$
Церулоплазмин в	23,72	31,45	27,77	24,78
сыворотке крови, мг/л	±2,05	±1,95*■	±1,80	±2,16
	30,3	40,56	44,80	34,90
Суточный объем мочи, мл	±3,6	±4,46	±3,55*	±2,54•
Vлепьный вес мони	1014,78	1014,44	1011,22	1011,22
удельный все мочи	±0,91	±4,66*	±1,63	±1,02*
Копропорфирин в моче	71,15	127,49	121,18	142,83
нМ/л	±9,80	±23,17*	±18,99*	±25,02*
Копропорфирин, в моче	2,05	4,86	4,99	4,98
нМ/24 ч	±0,28	±0,96*	±0,86*	±1,15*
$\delta_{\Lambda} \Pi K$ r more M/M/H	11,47	11,34	13,39	11,52
	±1,43	±1,34	±0,73	±1,30
$\delta_{\Lambda} \Pi K$ r more MKM/24 H	0,34	0,42	0,58	0,39
	±0,04	±0,07	±0,06*■	±0,04
Креатинин в моне ммоль/п	0,12	0,16	0,24	0,12
преатипин в моче, ммоль/л	±0,02	±0,02	±0,04*■	±0,01
Креатинин в моче,	4,07	6,78	11,25	4,24
мкмоль/24 ч	±0,91	±1,42	±2,16*■	±0,57
Масса селезенки г	0,81	1,01	1,05	0,89
	±0,04	±0,11	±0,09*	±0,08
Масса печечи г	7,44	9,13	9,34	7,94
	±0,37	±0,27*	±0,49*	±0,49

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «50 нм»; • – с группой «1 мкм» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Можно предположить, что возросшая утилизация железа для стимулированного синтеза гема приводит к тому, что содержание железа в сыворотке повышено по сравнению с контрольным при введении магнетита 10 нм

значимо меньше, чем при введении магнетита 50 нм, несмотря на то, что первый из них обладает более высокой растворимостью и, очевидно, в большей мере проникает в кровь из первичного депо на месте введения.

Вместе с тем, тот факт, что магнетит 1 мкм дал наименьшее и при том статистически не значимое повышение этого показателя, вполне соответствует наименее высокой растворимости микрометровых частиц. Однако трактовка биокинетики железа при внутрибрюшинном введении частиц магнетита разного размера усложняется тем обстоятельством, что в кровь, а через нее в паренхиматозные органы может проникать из первичного депо не только железо, резорбированное в ионо-молекулярной форме, но и не растворившиеся НЧ оксида железа, причем эта способность к прямой пенетрации, характерная для всех наночастиц, по всей вероятности, тем выше, чем они мельче. Задержавшись же из крови в органах, богатых клетками ретикуло-эндотелиальной системы, НЧ продолжают растворяться уже в них, причем и этот процесс должен быть сравнительно более интенсивен для мельчайших НЧ в силу их наиболее развитой суммарной поверхности, что может снизить итоговую задержку железа в ткани данного органа.

Результаты измерения содержания железа в тканях печени и селезенки вполне согласуются с этими гипотезами. Как видно из Рисунка 4.1.1 определяемая методом ААС концентрация суммарного железа в печени и в селезенке при внутрибрюшинном введении НЧ магнетита намного выше, чем при введении микрометровых частиц, при котором она лишь слегка и при том статистически не значимо выше, чем в органах контрольных крыс. В обоих органах (но особенно в селезенке) оно несколько ниже при введении НЧ 10 нм по сравнению с наночастицами 50 нм. В то же время, как видно из Рисунка 4.1.2, определяемое методом ЭПР железо в исходной химической форме магнетита (который может оказаться в ткани только при переносе в нее не растворившихся частиц), практически отсутствует в органах, как у контрольных крыс, так и у получавших магнетит 1 мкм, но при введении НЧ обоих размеров его содержание очень велико в печени и особенно в селезенке, причем и там, и там оно несколько ниже в случае наночастиц 10 мкм.

Эти два органа были выбраны как индикаторные для оценки зависимости биоаккумуляции железа (в органах, отдаленных от первичного депо) от размера частиц, учитывая значение этих органов для ретикуло-эндотелиальной системы, а также некоторые литературные био-распределении данные 0 других наноматериалов. Так, Yokel R.A. et al. (2009) нашли, что спустя 1 и 20 часов после суспензии внутривенного введения водной наночастиц оксида церия (приблизительно 31±4 нм) концентрации Се убывали в последовательности Содержание селезенка> печень> кровь> М03Γ. железа В крови крыс, подвергавшихся воздействию наночастиц, по нашим данным, также значительно ниже, чем в печени и селезенке, которые таким образом, выступают в качестве вторичных депо. При этом более высокое био-концентрирование в селезенке, чем в печени обнаружено и в отношении как суммарного железа, так и железа в форме магнетита при любом размере частиц (Рисунки 4.1.1, 4.1.2). Можно допустить, что преимущественная роль селезенки в накоплении железа связана с ее давно известной особой ролью в нормальном метаболизме этого элемента.



Рисунок 4.1.1 – Среднее значение суммарной концентрации железа в тканях (а) печени и (б) селезенки крыс по группам крыс, получавших магнетит с частицами разного размера. Метод ААС.

114



Рисунок 4.1.2 – Среднее значение концентрации железа в форме Fe₃O₄ в тканях (а) печени и (б) селезенки крыс по группам крыс, получавших магнетит с частицами разного размера. Метод ЭПР.

Некоторые морфометрические характеристики гистологических срезов печени свидетельствовали о более высоком гепатотоксическом действии магнетита 50 нм по сравнению с 10 нм (несмотря на то, что последний, как было показано в Главе 3, более цитотоксичен), при том, что оба класса наночастиц оказались более гепатотоксичными, чем микрочастицы того же магнетита (Таблица 4.1.2).

Это связано с тем, что оба названных органа накапливали НЧ диаметром 50 нм в большей массе, чем НЧ диаметром 10 нм (Рисунки 4.1.1, 4.1.2).

О том, что такое накопление железа в тканях может быть избыточным и приводить к его хорошо известным патологическим последствиям (гиперсидерозу), в проведенном эксперименте свидетельствуют не только показанное в Таблице 4.1.1 увеличение массы обоих органов (особенно при действии магнетита 50 нм), но и гистопатологические изменения в них.

При гистологическом исследовании найдено, что в печени крыс (Рисунки 4.1.3, 4.1.4), получавших НЧ, строение долек нарушено; имеет место дискомплексация печеночных балок за счет отложения в большом количестве железосодержащего пигмента в виде конгломератов в перипортальных зонах, интралобулярно, местами центрилобулярно и в виде отдельных частиц в синусоидах. Железосодержащий пигмент определяется также в цитоплазме клеток Купфера. Гепатоциты находятся в состоянии глубокой вакуольной

115

дистрофии, местами отмечается их цитолиз. При этом выраженность и распространенность патологических изменений при действии магнетита 50 нм несколько выше, чем при действии магнетита 10 нм.

Изменения же в печени крыс, получавших магнетит 1000 нм (1 мкм), минимальны. Балочное строение печени не нарушено, лишь в части гепатоцитов отмечается гиалиново-капельная дистрофия; портальные тракты интакты. Синусоидальные пространства свободны, единичные мелкие гранулы железосодержащего пигмента содержатся только в клетках Купфера.





Рисунок 4.1.3 – Обзорное микрофото среза печени. (а) контрольная группа; (б) магнетит 1000 нм; (в) магнетит 50 нм. Окраска на железо по Перлу с докраской ядер гематоксилином, увеличение x100.



a)



B) |

Рисунок 4.1.4 – Микрофото среза печени. (а) контрольная группа: строение печени соответствует гистологической норме, двуядерные гепатоциты в перипортальных зонах (1);

(б) магнетит 1000 нм: гепатоциты без патологических изменений, двуядерные гепатоциты (1), гранулы железосодержащего пигмента в единичных клетках Купфера (2);

(в) магнетит 50 нм - массивные отложения железосодержащих частиц перипортально и в синусоидах (1), в клетках Купфера (2), вакуольная дистрофия и кариолизис гепатоцитов (3). Окраска на железо по Перлу с докраской ядер гематоксилином, увеличение х 400.



a)

б)



Рисунок 4.1.5 – Обзорное микрофото среза селезенки. (а) контрольная группа; (б) магнетит 1000 нм; (в) магнетит 50 нм - конгломераты железосодержащих частиц в красной пульпе, гипоплазия лимфоидных фолликулов и интрафолликулярные отложения железосодержащих частиц (1). Окраска на железо по Перлу с докраской ядер гематоксилином, увеличение x100

В селезенке (Рисунок 4.1.5) также видны значительно более выраженные изменения при действии наночастиц обоих размеров (обширные отложения глыбок железосодержащего пигмента в красной пульпе, а иногда и в сдавленных фолликулах белой пульпы, в которых отмечаются светлые реактивные центры) по сравнению с действием микрометровых, при котором гистологическая картина этого органа мало отличается от контрольной. Заметных различий реакции этого органа на действие наночастиц двух испытанных размеров не обнаружено.

Морфометрические оценки приведены в Таблице 4.1.2 Обнаруженное при подсчете клеток повышение числа безъядерных гепатоцитов является безусловным, а снижение числа клеток Купфера – предположительным показателем повреждения печени, в то время как снижение числа двуядерных гепатоцитов может расцениваться как показатель подавления репаративной

пролиферации этих клеток. Эти сдвиги более всего выражены при действии наночастиц 50 нм и менее всего – при действии микрометровых частиц.

Таблица 4.1.2 – Некоторые морфометрические характеристики печени крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц магнетита разного размера в дозе 500 мг/кг, $(\overline{X \pm S_x})$

	Группы крыс, получавшие			
Показатели	Воду	Магнетит		
	(контроль)	10 нм	50 нм	1 мкм
Число безъядерных	13,1	37,0	44,4	19,6
гепатоцитов	±0,9	±1,6*•■	±1,3*■	±1,7*
Число двуядерных	5,1	2,3	2,0	6,1
гепатоцитов	±0,5	±0,3*■	±0,3 * ■	±0,6
Инана кноток Кушфара	27,2	31,8	19,2	33,2
число клеток Купфера	±1,6	±2,0•	±3,3@■	±0,4*

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • с группой «50 нм»; • – с группой «1 мкм» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента); @ – статистически значимое различие с группой «контроль» по критерию Манна-Уитни (во всех остальных случаях оценка значимости по обоим критериям совпадает).

Как выше результатов морфологического видно из описанных И морфометрического исследования, выраженность И распространенность гистопатологических изменений в печени под действием магнетита 50 нм несколько выше, чем под действием магнетита 10 нм. Более высокая гепатотоксичность первого вполне соответствует более высокому накоплению этих наночастиц в органе, хотя вполне вероятно, что магнетит 10 нм, не случайно вызвавший наиболее выраженные сдвиги большинства показателей интоксикации, рассматривавшихся выше, более цитотоксичен для клеток печени подобно тому, как он был более цитотоксичным для легочных макрофагов. Изменения же в печени крыс, получавших магнетит 1 мкм, минимальны, что можно связать как с незначительным переходом этого материала в печень, так и с меньшей его клеточно-тканевой токсичностью. Вместе с тем, в селезенке количественных различий гистопатологическими между изменениями, вызываемыми наночастицами разного размера выявить не удалось. Однако масса обоих органов при действии частиц 50 нм на 2-3 % свыше, чем при действии частиц 10 нм (Таблица 4.1.1).

4.1.2. Оценка субхронического токсического действия наночастиц оксида никеля двух размеров

Для дальнейшего изучения зависимости токсичности от размерного фактора внутри нанометрового диапазона был проведен еще один эксперимент с НЧ оксида никеля NiO двух размеров 11 нм и 25 нм.

Суспензии каждого размера НЧ NiO вводили внутрибрюшинно по 3 раза в неделю в течение 6 недель. Разовая доза составляла 4,0 мг/кг, контрольной группе вводили воду без частиц.

Как видно из Таблицы 4.1.3 совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что введение НЧ NiO как 11 нм, так 25 нм вызывает развитие умеренной интоксикации.

Таблица 4.1.3 — Некоторые показатели состояния организма крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц оксида никеля разного размера в дозе 4,0 мг/кг, $(X_{cp} \pm S_x)$

Показатели	Группы крыс, получавшие				
	Воду (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм		
Масса до затравки, г	$202,31 \pm 5,95$	$211,15 \pm 2,20$	$213,85 \pm 3,11$		
Прирост массы, %	$18,55 \pm 3,79$	$15,14 \pm 1,76$	$13,64 \pm 2,52$		
Масса легких, на 100 г м.т.	$0,57 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,03$		
Масса печени, на 100 г м.т.	$3,92 \pm 0,25$	$4,15 \pm 0,16$	$4,23 \pm 0,18$		
Масса почек, на 100 г м.т.	$0,60 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,02$		
Масса селезенки, на 100 г м.т.	$0,21 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	0,25 ± 0,01 *		
Масса мозга, на 100 г м.т.	$0,81 \pm 0,08$	$0,75 \pm 0,02*$	$0,82 \pm 0,02 \bullet$		
Масса сердца, на 100 г м.т.	$0,32 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$		
СПП, сек	$14,89 \pm 0,69$	$15,88 \pm 0,99$	$14,39 \pm 0,94$		
Число заглядываний в норки за 3					
МИН	$4,\!69 \pm 0,\!77$	1,54 ± 0,35 *	1,54 ± 0,45 *		
Перемещения по квадратам за 3					
мин	$9,85 \pm 1,63$	4,23 ± 0,75 *	3,08 ± 0,52 *		

Показатели	Группы крыс, получавшие			
	Воду (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм	
Общее количество движений на				
«открытом поле» за 3 мин	$18,77 \pm 2,66$	7,08 ± 1,24 *	5,85 ± 1,02 *	
Эритроциты, 10 ¹² /мл	$7,64 \pm 0,13$	7,24 ± 0,13 *	$7,79 \pm 0,38$	
	$144,00 \pm$	133,54 ±	$142,62 \pm$	
Гемоглобин, г/л	1,24	1,81 *	6,90	
	19,29 ±	18,10 ±	19,57 ±	
Гематокрит, %	0,21	0,29 *	1,02	
	626,31 ±		688,15 ±	
Тромбоциты, 10 ⁶ /мл	34,83	$632,62 \pm 66,89$	59,33	
	8,14 ±	10,86 ±	$10,22 \pm$	
Лейкоциты, 10 ⁶ /мл	0,48	0,77 *	0,82 *	
Базофилы, %	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	
Эозинофилы, %	$4,46 \pm 0,42$	$5,00 \pm 0,71$	$4,08 \pm 0,73$	
Палочкоядерные нейтрофилы, %	$1,38 \pm 0,18$	$1,00 \pm 0,00$ *	1,00 ± 0,00 *	
	21,23 ±	30,85 ±	29,69 ±	
Сегментоядерные нейтрофилы, %	0,98	1,00 *	1,02 *	
Моноциты, %	$5,69 \pm 0,36$	$5,85 \pm 0,30$	$5,69 \pm 0,29$	
	67,23 ±	57,31 ±	59,54 ±	
Лимфоциты, %	1,14	1,44 *	1,20 *	
· · · ·	75,25 ±	68,46 ±	72,73 ±	
Общий белок, г/л	1,36	1,16 *	1,48*•	
	38,92 ±	33,39 ±	34,52 ±	
Альбумин, г/л	0,86	0,68 *	0,83*	
Глобулин, г/л	$36,33 \pm 1,04$	$35,07 \pm 0,72$	$37,28 \pm 1,08$	
А/Г индекс	$1,08 \pm 0,04$	0,96 ± 0,02 *	0,93 ± 0,03 *	
ЩФ, Е/л	$240,75 \pm 13,37$	$242,57 \pm 14,44$	202,98 ± 8,53*•	
	330,16 ±		229,09 ±	
АСТ, Е/л	59,58	$239,68 \pm 20,04$	27,28	
АЛТ, Е/л	94,39 ± 13,55	61,88 ± 4,20 *	58,75 ± 3,09 *	
Коэф. Де Ритиса	$3,52 \pm 0,15$	$3,92 \pm 0,28$	$3,83 \pm 0,28$	
Амилаза, Е/л	4714,62 ± 379,26	4939,31 ± 482,23	$4685,69 \pm 400,06$	
Билирубин общий, мкмоль/л	$0,87 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,09$	$0,81 \pm 0,08$	
ЛДГ, Е/л	$2961,11 \pm 367,27$	$2405,01 \pm 274,56$	$2670,77 \pm 228,89$	
Креатинин, мкмоль/л	$34,85 \pm 1,54$	$34,65 \pm 1,11$	$34,58 \pm 1,21$	
ГГТП, Е/л	$4,50 \pm 0,83$	$4,07 \pm 0,39$	2,27 ± 0,46 *•	
Хс-ЛПВП, ммоль/л	$1,18 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,05*$	$1,07 \pm 0,09$	
Хс-ЛПНП, ммоль/л	$0,14 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01*$	$0,24 \pm 0,05*$	
Холестерин, ммоль/л	$1,69 \pm 0,05$	$1,62 \pm 0.05$	$1,76 \pm 0,13$	
Триглицериды, ммоль/л	$1,10 \pm 0.09$	1,57 ± 0,12 *	$1,51 \pm 0.09$ *	
Мочевая кислота, мкмоль/л	$157,33 \pm 12,87$	$130,92 \pm 9,95$	$121,58 \pm 7,09*$	
Мочевина, ммоль/л	$2,91 \pm 0.25$	$2,86 \pm 0.16$	$3,07 \pm 0.20$	
SH-группы, ммоль/л	$2,36 \pm 0.73$	8,28±2,10*	4,74 ± 0,66 *	
Восстановленный глютатион в	, ,	, - ,- •	, -,	
гемолизате крови, мкмоль/л	$47,82 \pm 8,54$	$32,32 \pm 5,24$	$31,85 \pm 4,99$	

Группы крыс, получавшие			
Воду (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм	
$0,53 \pm 0,02$	$0,\!49 \pm 0,\!03$	$0,43 \pm 0,04*$	
$5,20 \pm 0,72$	$3,54 \pm 0,31*$	$4,25 \pm 0,24$	
$137,03 \pm$	$197,90 \pm$	$196,15 \pm$	
12,34	8,46 *	7,81 *	
$22,92 \pm 2,62$	$17,15 \pm 2,50$	$19,15 \pm 2,71$	
133,85 ±		$154,77 \pm$	
22,81	$175,09 \pm 47,06$	31,27	
$13,13 \pm 1,39$	$20,99 \pm 2,56*$	39,79 ± 8,94*•	
$1,73 \pm 0,22$	$2,12 \pm 0,28$	$1,81 \pm 0,17$	
$0,97 \pm 0,01$	$0,\!87\pm0,\!05$	$0,91 \pm 0,10$	
225,12 ±		$172,10 \pm$	
29,96	$221,39 \pm 34,33$	16,98	
$173,08 \pm 16,13$	258,46 ± 37,78*	$21\overline{9,83} \pm 27,04$	
181,68 ±		$205,39 \pm$	
18,87	259,21 ± 29,96*	16,57	
	Груг Воду (контроль) $0,53 \pm 0,02$ $5,20 \pm 0,72$ $137,03 \pm$ $12,34$ $22,92 \pm 2,62$ $133,85 \pm$ $22,81$ $13,13 \pm 1,39$ $1,73 \pm 0,22$ $0,97 \pm 0,01$ $225,12 \pm$ $29,96$ $173,08 \pm 16,13$ $181,68 \pm$ $18,87$	Группы крыс, получавиВоду (контроль)NiO 11 нм $0,53 \pm 0,02$ $0,49 \pm 0,03$ $5,20 \pm 0,72$ $3,54 \pm 0,31^*$ $137,03 \pm$ $197,90 \pm$ $12,34$ $8,46^*$ $22,92 \pm 2,62$ $17,15 \pm 2,50$ $133,85 \pm$ $22,81$ $22,81$ $175,09 \pm 47,06$ $13,13 \pm 1,39$ $20,99 \pm 2,56^*$ $1,73 \pm 0,22$ $2,12 \pm 0,28$ $0,97 \pm 0,01$ $0,87 \pm 0,05$ $225,12 \pm$ $221,39 \pm 34,33$ $173,08 \pm 16,13$ $258,46 \pm 37,78^*$ $181,68 \pm$ $18,87$ $259,21 \pm 29,96^*$	

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «NiO 11 нм» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

В обеих NiO-экспонированных группах были заторможены исследовательское поведение (число заглядываний в норки) и общая двигательная активность. Однако относительная масса головного мозга была снижена статистически значимо при введении HЧ NiO малого размера и не изменена при введении HЧ большего диаметра.

При рассмотрении показателей органо-системного уровня, придается значение одинаковой в обеих экспериментальных группах направленности ряда выявленных эффектов, независимо от их выраженности и статистической значимости. Например, на гепатотосичность никель-оксидных НЧ указывает дважды отмеченное повышение относительной массы печени, значимое снижение содержания общего белка, альбуминов и альбумин-глобулинового индекса в сыворотке крови. Об угнетении энзимо-образовательной функции печени говорит то, что уровни обеих аминотрансфераз в сыворотке крови были не повышены, а снижены (АЛТ статистически значимо в обоих случаях), снижен уровень мочевой кислоты в сыворотке крови (при действии больших НЧ статистически значимое). Снижение активности щелочной фосфатазы и гамма-глютамил транспептидазы наблюдалось только при действии НЧ 25 нм.

НЧ NiO оказывают влияние на выделительную функцию почек, о чем свидетельствует повышение содержания мочевины и мочевой кислоты в моче (при действии малых НЧ статистически значимое).

Отмечаются изменения со стороны как белой, так и красной крови. Так, при введении НЧ обоих размеров наблюдается лейкоцитоз, снижение процента лимфоцитов и сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону сегментоядерных нейтрофилов. Содержание гемоглобина, а также число эритроцитов и гематокрит были снижены (статистически значимо) только при введении НЧ 11 нм, а при введении НЧ 25 нм эти показатели не отличались от контрольных.

То или иное влияние различных химических форм никеля на эритропоэз не является чем-то новым, хотя указаний на подобное действие наночастиц этого металла найдено не было. Наблюдали (Sunderman F.W. et al., 1982) усиленное образование эритропоэтина с повышением гематокрита у свинок и крыс при интраренальном введении субсульфида никеля. Вместе с тем, известно и развитие анемии у крыс при интоксикации, например, хлоридом никеля (Adjroud O., 2013).

Концентрация дельта-аминолевулиновой кислоты (δ-АЛК) в моче была статистически значимо повышена при введении наночастиц обоих размеров по сравнению с контролем, но при введении НЧ 25 нм статистически значимо выше, чем при введении 11 нм. Поэтому можно допустить, что развитие никелевой анемии (подобно развитию свинцовой) хотя бы отчасти связано с токсическим торможением синтеза гема. Вместе с тем нельзя исключить и ее связи с усиленным эндогенным гемолизом, поскольку давно показано (Tkeshelashvili L. et аl., 1989), что при никелевой интоксикации ускоряется развитие тех изменений эритроцитарной поверхности, по которым резидентные макрофаги красной пульпы селезенки распознают стареющие эритроциты и захватывают их из кровотока с последующим разрушением. Однако изменения показателей красной крови найдено только при действии малых НЧ. Вероятнее всего, данное проявление токсического действия при введении больших частиц еще не успело развиться либо компенсируется адаптационными резервами организма. Об этом свидетельствует статистически значимо повышенный уровень церулоплазмина в сыворотке крови в обеих группах. Его повышение происходит в ответ на анемию посредством активации транскрипции гена церулоплазмина фактором (HIF-1), индуцируемым гипоксией который также активирует в т.ч. гены эритропоэтина (Ho J.J. et al., 1996; Mukhopadhyay C.K. et al., 2000).

Кроме того, церулоплазмин обладает антиоксидантными свойствами, поскольку способен вызывать дисмутацию супероксид аниона, которая имеет не ферментативный, а стехиометрический характер, таким образом происходит восстановление O₂ до воды, а не до перекисей, в отличие от других антиоксидантных ферментов (Бердинских Н.К. с соавт., 1975), чем и можно объяснить статистически значимое снижение уровня МДА в сыворотке крови при действии частиц 11 нм.

Об изменении состояния антиоксидантной системы под влиянием НЧ NiO можно судить и по заметно сниженной активности каталазы в сыворотке крови (при введении больших НЧ статистически значимой). Повышенное общем содержании SH-групп в сыворотке крови, значимое при введении обоих размеров НЧ NiO, нередко наблюдается при действии токсичных металлов может быть объяснено «развертыванием» глобулярной белковой молекулы при ее денатурации.

Наблюдалось системное торможение окислительно-восстановительного энергообмена при введении НЧ обоих размеров, однако более выраженное при введении 11 нм, которое было оценено по угнетению активности сукцинат дегидрогеназы в лимфоцитах крови. Это торможение многократно наблюдалось в экспериментах практически со всеми нанометаллами. Однако, имеющий сходную токсикологическую интерпретацию показатель снижения уровня, восстановленного глютатиона в цельной крови, имел тенденцию к снижению.

127

Введенные НЧ NiO обладают способностью негативно влиять на липидный обмен. Так, под их воздействием в сыворотке крови были повышены триглицериды, снижены липопротеиды высокой плотности, повышены липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), повышение последних согласуется с повышенным церулоплазмином, способность которого ускорять окисление ЛПНП хорошо известна (Feichtenhofer S. et al., 2001; Exner M. et al., 2002; Leoni V. et al., 2002).

В обеих NiO-экспонированных группах заторможены как исследовательское поведение (число заглядываний в норки), так и общая двигательная активность (изменение этих показателей статистически значимо), хотя относительная масса головного мозга была снижена статистически значимо при введении HЧ NiO малого размера и не изменена при введении HЧ большего диаметра.

Об изменении со стороны селезенки говорит увеличение ее относительного массового показателя, значимое при введении больших наночастиц (Таблица 4.1.3) и гистопатологические изменения в ней. Некоторые морфометрические характеристики гистологических срезов селезенки также свидетельствовали о более высоком спленотоксическом действии 25 нм НЧ NiO по сравнению с 11 нм (Таблица 4.1.4). Это может быть объяснено тем, что в селезенке частицы диаметром 25 нм накапливались в большей массе, чем частиц диаметром 11 нм (Таблица 4.1.5), в печени же как гистопатологические нарушения выражены примерно в равной степени при введении 11 нм НЧ и 25 нм, так и накопление никеля, причем в обоих органах намного выше, чем в органах контрольных крыс.

Таблица 4.1.4 – Некоторые морфометрические показатели печени и селезенки крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц оксида никеля разного размера в дозе 4,0 мг/кг, $(\overline{X \pm S_x})$

Показатели:	Группы крыс, получавшие				
	Воду (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм		
	Печ	чень,			
	количество на 1	00 клеток печени			
Безъядерные					
гепатоциты	23,43±0,85	41,29±1,54*	48,73±1,35*•		
Двухядерные					
гепатоциты	4,47±0,49	4,52±0,52	2,23±0,31*•		
	Селе	езенка			
Отношение красной					
пульпы к белой	7,71±1,62	4,27±0,067	3,50±0,49*		
Диаметр фоликула,					
МКМ	11,94±0,35	9,71±0,30*	10,21±0,24*		

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «NiO 11 нм» (при $p \leq 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 4.1.5 — Содержание никеля в лиофилизированной ткани крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц оксида никеля разного размера в дозе 4,0 мг/кг, оцененное атомно- эмиссионной спектроскопией и электронным-парамагнитным резонансом, мкг/г, ($\overline{X \pm S_x}$)

Органы	Метод	Группы крыс, получавшие			
-	измерения	Воду (контроль)	НЧ NiO 11 нм	НЧ NiO 25 нм	
Печень	АЭС	1,25±0,42	51,28±5,3*	50,15±3,29*	
	ЭПР	0,77±0,21	9,9±0,8*	10,4±1,6*	
Селезенка	АЭС	4,6±1,0	24,4±2,4*	40,1 ±5,9*•	
	ЭПР	0,81±0,40	17,27±3,37*	30,47±7,72*	

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «NiO 11 нм» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

При электронной микроскопии ткани печени и селезенки НЧ NiO, как 11 нм, так и 25 хорошо визуализируются. Отмечается нарушение двуконтурности мембраны митохондрий при контакте их с наночастицами (Рисунок 4.1.6). Деструкцию митохондрий при действии наночастиц наблюдали во всех ранее проведенных экспериментах. В гепатоцитах крыс, после введения больших НЧ NiO отмечается дезорганизация цитоплазмы проявляющаяся в разрозненном состоянии органелл клетки друг относительно друга (Рисунок 4.1.7.а). Подобная

закономерность отмечается и в группе с малыми НЧ NiO, однако дезорганизация выражена слабее (Рисунок 4.1.7.б).



Рисунок 4.1.6 – Печень крысы после внутрибрюшинного введения НЧ NiO 25 нм в течение 6 недель. Цитоплазма гепатоцита. Видны электроноплотные наночастицы. В месте контакта наблюдается нарушение двуконтурности мембраны митохондрии. STEM, увеличение x19030.



Рисунок 4.1.7 – Печень крысы после внутрибрюшинного введения в течение 6 недель НЧ NiO. Дезорганизация цитоплазмы. Видны электроноплотные наночастицы. (а) НЧ NiO 25 нм. (б) НЧ NiO 11 нм. STEM, увеличение х7950 и 13330 соответственно.

В селезенке у крыс после введения НЧ NiO 25 нм встречаются единичные внутриклеточным мембранным клетки c развитым лабиринтом (эндоплазматической сетью) и мелкими электроноплотными везикулами (Рисунок 4.1.8), при этом изменения внутриклеточной организации не наблюдается. В обеих группах отмечаются единичные разрушенные клетки и незначительная вакуолизация цитоплазмы отдельных клеток. Подобные ультраструктурные изменения клетки под действием никеля описаны Юровой А.В. (1989). Ею были найдены деструкция митохондрий, расширение цистерн эндоплазматической сети с накоплением в них электронно-плотного содержимого, а также гипертрофия ядрышек, комплекса Гольджи и появление атипичных полисом (в виде спиралей и цепочек) и кристаллоподобных включений, окруженных мембраной.

Однако при действии НЧ NiO 11 нм аналогичных изменений мембранного лабиринта не обнаружено.



Рисунок 4.1.8 – Селезенка крысы после внутрибрюшинного введения H4 NiO 25 нм в течение 6 недель. Цитоплазма клетки с внутриклеточным мембранным лабиринтом и мелкими электроноплотными везикулами. STEM, увеличение x8200.

Таким образом, соотношение между размерами частиц внутри нанометрового диапазона и их токсичностью и в этом эксперименте оказалось не однозначным.

Кроме того, обнаруживается разница и в накоплении НЧ в органах. Так, концентрация никеля, определяемая методом ААС в печени одинакова как при введении 11 нм НЧ так и 25 нм, однако в селезенке НЧ 11 нм накопилось статистически значимо меньше, чем 25 нм (в обоих органах намного выше, чем в органах контрольных крыс).

Такая разница в накоплении может быть объяснена сложными соотношениями между более высокой способностью мельчайших НЧ к пенетрации в кровь из первичного депо и затем в клетки органов из крови, с одной стороны, и их менее длительной ретенцией в клетках ввиду большей растворимости и большей цитотоксичности, с другой. Как видно из Рисунка 4.1.9, НЧ NiO изучаемых размеров имели достаточную высокую растворимость даже в дистиллированной воде (за 100 часов растворяются 40 % частиц как 11 нм, так 25 нм), тем не менее, в сыворотке растворение происходит еще интенсивнее – 57 % растворяются НЧ 25 нм и гораздо сильнее растворяются 11 нм - 83 % за это же время (Рисунок 4.1.10). Это позволяет предположить более интенсивную солюбилизацию меньших наночастиц в организме, что с одной стороны, может усилить их резорбтивную токсичность, но с другой – снизить накопление таких НЧ в органах, и тем самым – токсическое поражение последних.

Баланс между этими двумя механизмами может быть различен для НЧ разных веществ и разных размеров, что и демонстрируется неполнотой совпадения результатов в экспериментах с Fe₃O₄ и с NiO. К тому же, разница размеров, сравниваемых НЧ в первом из них была 5-кратной, а во втором только приблизительно 2-кратной. Тем не менее, общий вывод о неоднозначности значения размера металлооксидных частицы в пределах нанометрового диапазона как характеристики, определяющей уровень их токсичности, подтвердился.



Рисунок 4.1.9 – Динамика растворения наночастиц NiO в дистиллированной воде а) NiO 11 нм, б) NiO 25 нм. Измерения проводились методом ЭПР.



Рисунок 4.1.10 – Динамика растворения наночастиц NiO в сыворотке а) NiO 11 нч, б) NiO 25 нм. Измерения проводились методом ЭПР.

4.1.3. Оценка генотоксического эффекта медьсодержащих частиц двух размеров

В следующем эксперименте оценивался генотоксический эффект НЧ меди 20 нм и МЧ меди 340 нм после внутрибрюшинного введения в дозе 10 мг/кг 3 раза в неделю в течение 6 недель. Судя по коэффициенту фрагментации геномной ДНК, оцененной в ПДАФ тесте клеток разных органов (Таблица 4.1.6) оба типа изученных частиц обладают генотоксическим действием *in vivo*. При этом различия между НЧ и МЧ по влиянию на коэффициент фрагментации ДНК невелики и неоднозначны: если в селезенке оно более выражено при действии НЧ, то в костном мозге – при действии МЧ, а в печени примерно одинаково (Таблица 4.1.6).

То, что увеличение коэффициента фрагментации ядерной (геномной) ДНК ни при действии НЧ, ни при действии МЧ не было отмечено в клетках головного мозга, вероятнее всего, не объясняется малым накоплением меди в этом органе, которое, как показано в Таблице 4.1.7 все же больше, чем в селезенке, в которой этот эффект обнаружен. Основную роль, вероятнее всего, играет отсутствие митотической активности у нейронов. Следует учесть, что исчезновение ядерной мембраны в процессе митоза, начиная с прометафазы и включая мета- и анафазы, делает геномную ДНК наиболее доступной контакту с любым повреждающим фактором, попавшим внутрь клетки. Поэтому неделящаяся клетка обладает повышенной устойчивостью к генотоксическому действию.

Таблица 4.1.6 — Коэффициенты фрагментации геномной ДНК крыс после повторных внутрибрюшинных введений медьсодержащих частиц разного размера в дозе 10 мг/кг, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Органы	Группы, получавшие				
	Воду (контроль)	НЧ 20 нм	МЧ 340 нм		
Печень	0,396±0,0020	0,426±0,0020*	0,421±0,0030*		
Селезенка	0,369±0,0016	0,460±0,0020*°	0,391±0,0023*		
Головной	0,354±0,0028	0,355±0,0020°	0,347±0,0020*		
мозг					
Костный	$0,391 \pm 0,0015$	0,355±0,0017*°	0,399± 0,0017*		
мозг					

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; $^{\circ}$ – с группой «МЧ 340 нм» (при <u>p</u> \leq 0,05 по t-критерию Стьюдента).

Однако в костном мозгу – ткани, пролиферативная (митотическая) активность которой весьма высока, не наблюдалось увеличение Кфр при действии медьсодержащих НЧ, зато этот эффект дали медьсодержащие МЧ. Допустимо предположить, что последнее объясняется боле существенной задержкой малорастворимых МЧ тканью, богатой фагоцитирующими клетками.

Действительно, масса меди, которая накапливается в печени, при введении МЧ больше, чем при введении НЧ, а селезенке и головном мозгу медь при

действии НЧ и МЧ накапливается примерно в равной степени, но все же с тенденцией к большему накоплению в случае МЧ (Таблица 4.1.7).

Таблица 4.1.7 – Содержание меди в лиофилизированной ткани у крыс после повторных внутрибрюшинных введений медьсодержащих частиц разных размеров в дозе 10 мг/кг, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Группы крыс, получавшие	Почки	Печень	Селезенка	Головной мозг
Воду (контроль)	42,4±2,9	12,2±2,4	22,5±2,1	18,9±0,7
НЧ 20 нм	62,5±7,1*	28,8±6,3*°	24,2±1,5	21,5±1,7
МЧ 340 нм	70,8±8,7*	153,7±13,7*	25,3±4,7	22,1±0,8*

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; ° – с группой «МЧ 340 нм» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

4.2. Сравнительная оценка субхронической токсичности наночастиц разной химической природы

Сравнительная токсичность равноразмерных наночастиц предопределяется их химической природой, что показано в субхроническом эксперименте при параллельном сопоставлении НЧ серебра и золота практически одинакового размера (НЧ Ag (49 нм и НЧ Au 50 нм). Животные подвергались 18-кратному введению суспензий наночастиц в течение 6 недель в однократной дозе 10 мг/кг.

Таблица 4.2.1 – Показатели состояния организма крыс после повторных внутрибрюшинных введений наночастиц серебра или золота

Показатели	Группы крыс, получавшие			
	Воду	НЧ Au	НЧ Ад	
	(контроль)			
Масса тела исходная, г	196,25±2,62	197,1±2,41	197,1±2,25	
Масса тела после	234,5±5,38	235,83±4,30	232,08±4,71	
затравки, г				
СПП,сек.	13,5±1,04	15,9±0,71	15,28±1,27	
Норковый рефлекс, кол-	6,0±0,89	7,36±0,66	7,33±1,11	
во загляд. за 3 мин				
Гемоглобин в крови, г/л	147,9±4,0	134,6±2,6*	139,9±3,6	
Эритроциты, 10 ¹² г/л	4,34±0,04	4,04±0,08*	3,87±0,13*	

в дозе 10 мг/кг, $(X_{cp} \pm S_x)$

Показатели	Группы крыс, получавшие				
	Воду	НЧ Аи	НЧ Ад		
	(контроль)				
Цветной .показатель	1,73±0,06	1,69±0,03	1,86±0,089		
Ретикулоциты, ‰	27,17±5,45	22,67±4,15	31,67±3,25		
Лимфоциты, %	46,8±2,94	49,0±3,04	50,9±2,42		
Сегментоядерные	38,9±2,99	32,0±2,6	32,75±2,42		
нейтрофилы,%					
Палочкоядерные	2,5±0,28	3,08±0,5	2,84±0,53		
нейтрофилы, %					
Моноциты, %	5,6±0,77	9,08±0,74*	7,5±0,64		
Эозинофилы, %	6,3±0,7	6,1±0,8	5,8±0,9		
Базофилы, %	0,73±0,23	0,67±0,28	0,5±0,15		
Общий белок в	74,0±1,6	72,96±1,77	75,4±2,5		
сыворотке крови, г/л			, ,		
Альбумины в сыворотке	43,1±1,68	43,5±1,12	41,44±1,04		
крови, г/л			, ,		
Глобулины сыворотке	31,6±1,80	29,45±1,35	33,92±2,49		
крови, г/л					
А/Г индекс	1,39±0,10	1,51±0,08	1,28±0,08		
Активность СДГ, число	805,33±12,6	666,17±8,09*	679,9±12,4*		
гранул в 50 лимфоцитах					
Активность АлТ в	0,19±0,02	0,15±0,02	0,20±0,025		
сыворотке крови,					
ммоль/ч*л					
Активность АсТ в	0,25±0,016	0,26±0,02	0,3±0,02		
сыворотке крови,					
ммоль/ч*л					
Коэфф. де Ритиса	1,41±0,19	2,29±0,43	1,73±0,26		
Каталаза в сыворотке	1,14±0,23	1,31±0,16	1,22±0,19		
крови, мкмоль/л					
МДА в сыворотке крови	5,84±0,22	5,38±0,31°	6,23±0,14		
нмоль/л					
Церулоплазмин в	164,5±20,0	126,15±11,7°	78,75±8,6*		
сыворотке крови, мг %					
Билирубин в сыворотке	1,58±0,09	1,4±0,07	1,52±0,12		
крови, мкмоль/л					
ү-глутамилтрансфераза,	3,25±0,8	1,8±0,29	2,72±0,65		
Ед/л					
Щелочная фосфатаза в	92,54±13,4	86,7±11,9	119,6±17,4		
сыворотке крови, Ед/л					
Креатинин в сыворотке	33,2±1,2	35,2±1,43	35,54±1,5		
крови, мкмоль/л					
Суточный объем мочи,	49,8±5,01	39,6±5,1	44,4±5, 6 3		
МЛ					
Кислотность мочи,	7,88±0,3	7,31±0,4	7,25±0,2		
единицы рН					

Показатели	Группы крыс, получавшие			
	Воду	НЧ Au	НЧ Ад	
	(контроль)			
Удельный вес мочи	1,015±0,0005	1,014±0,0008	1,014±0,0006	
Креатинин в моче,	$0,7{\pm}0,05$	0,84±0,07	0,84±0,09	
моль/л				
Копропорфирин в моче,	44,0±7,4	54,4±15,05	54,4±7,73	
нмоль/л				
δ –АЛКв моче, мкмоль/л	7,6±0,58	6,0±0,98	7,2±0,49	
оксипролин в моче,	0,90±0,2	0,50±0,09	0,74±0,11	
мкМоль/сут				
Масса печени, г	3,31±0,11	3,41±0,09	3,35±0,09	
Масса почек, г	0,66±0,013	0,615±0,015*	0,63±0,015	
Масса селезенки, г	0,41±0,02	0,37±0,02	$0,44\pm0,04$	

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; $^{\circ}$ – с группой «НЧ Ag» (при p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).

Как видно из Таблицы 4.2.1, лишь небольшое число из использованных 36 функциональных показателей состояния организма при действии НЧ Аи или НЧ Ag отличалось статистически значимо ОТ соответствующих показателей контрольной группы. В частности, при действии НЧ Аи наблюдалось: снижение содержания гемоглобина и числа эритроцитов в крови, увеличение процента моноцитов лейкоцитарной формуле, В снижение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови; снижение содержания МДА и снижение массы почек.

Под влиянием НЧ Ад статистически значимо снизились число эритроцитов, активность СДГ и уровень церулоплазмина (основного медьсодержащего белка крови). Этот сдвиг, наблюдаемый (хотя и при недостаточной статистической значимости) и при действии НЧ Au. возможно, является следствием (поскольку гепатотоксичности этих нанометаллов синтез сывороточного церулоплазмина осуществляется гепатоцитами) или же развивается вследствие вызываемой ими мутации «церулоплазминового» гена (СР), контролирующих этот синтез. Отметим однако, что в описанном выше эксперименте с НЧ которые вводились В значительно более высокой дозировке, магнетита, отмечалось изменение ряда показателей характеризующих явное повреждение

печени, но при этом никаких изменений содержания церулоплазмина в крови не было. Таким образом, его снижение при действии НЧ Au и особенно НЧ Ag относительно специфично и, вероятно, отражает конкурентные отношения между серебром и золотом, с одной стороны, и медью как био-микроэлементом – с другой.

Наблюдалось усиление перекисного окисления липидов, оцениваемое повышением уровня малонилдиальдегида (МДА). Хотя это повышение по сравнению с контрольным уровнем и было под влиянием НЧ Аg статистически не значимым, но все же этот показатель в группе НЧ Аg был значимо выше, чем в группе НЧ Аu.

Значимое для обоих нанометаллов снижение числа эритроцитов по сравнению с контролем тоже наиболее выражено под влиянием НЧ Ag, хотя отличие от соответствующего эффекта действия НЧ Au статистически недостаточно значимо. В то же время, повышение процента моноцитов под влиянием НЧ Ag было менее выраженным, чем под влиянием НЧ Au, а снижение активности СДГ было практически одинаковым (даже чуть менее выраженным под влиянием НЧ Ag).

Таким образом, использованная в этом эксперименте обоих доза нанометаллов оказалась близкой к пороговой при неоднозначных И не выраженных различиях между вызванными ими сдвигами различных показателей системной токсичности. Подобные различия вообще трудно выявляются при низких уровнях эффектов каждого из сопоставляемых воздействий. Вместе с тем, существует, возможно, и объективная причина того, что НЧ Аи и НЧ Аg, острая цитотоксичность которых на клеточном уровне оказалась явно неодинаковой (Глава 3), обладают весьма близкой субхронической токсичностью на системном уровне. Причина эта состоит в том, что в некоторых органах-мишенях (печени и почках) Au накапливается больше, чем Ag, что будет обсуждено далее и это различие нивелирует противоположные по частично знаку различия цитотоксичности для клеток тех же органов.

Гистологическое изучение печени, почек и селезенки выявило не только патологические изменения, но иногда и их различие при действии НЧ Аи и НЧ Ад. Так, при микроскопическом исследовании срезов печени крыс всех подопытных групп, но не контрольной группы, в цитоплазме макрофагов (клеток Купфера) видны гранулы коричневого и золотисто-коричневого цвета, вероятно, являющиеся агрегатами введенных наночастиц (Рисунок 4.2.1). В гепатоцитах отмечаются умеренно выраженные дистрофические изменения. В синусоидах появляются мононуклеары и единичные сегментоядерные лейкоциты, но лишь в небольшом количестве. Строма портальных трактов, даже при отложении в них обнаружено заметных частиц. не изменена. При ЭТОМ не различий гистологической картины печени при введении HY Au и HY Ag.

Таблица 4.2.2 – Некоторые морфометрические показатели клеточной структуры печени и селезенки крыс после повторных внутрибрюшинных введений наночастиц серебра или золота в дозе 10 мг/кг, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Показатели		-	
	Контроль	НЧ Au	НЧ Ад
Число безъядерных	17,6±0,6	19,1±0,2	18,5±1,3
гепатоцитов			
Число двуядерных	5,9±0,8	8,7±0,6*	7,8±0,6
гепатоцитов			
Число клеток Купфера	16,5±0,5	25,3±0,6*	25,0±0,8*
Средневзвешенный	0	0,35±0,08	0,91±0,7
балл нагруженности			
клеток Купфера			
частицами ³			
Отношение белой к	0,59±0,036	0,37±0,028*	0,37±0,035*
красной пульпе			
селезенки ⁴			

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; $^{\circ}$ – с группой «НЧ Ag» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Судя по морфометрическим показателям, приведенным в Таблице 4.2.2, число двуядерных гепатоцитов, который служит косвенным показателем

³ Визуальная оценка нагруженности клетки частицами выражается в баллах от 0 до 4. Средневзвешенный показатель рассчитывается с учетом процентного соотношения между клетками, оцененными разными баллами (общее число оцененных клеток - 100).

⁴ Результаты планиметрии с помощью сетки Автандилова

репаративного усиления митотической активнгсти выше, чем в контрольной группе под влиянием только нанозолота. Существенным морфометрическим показателем измененного состояния печени являлось увеличение приблизительно в 1,5 раза числа клеток Купфера под влиянием обоих НЧ. При этом, хотя данный сдвиг был практически одинаков при действии наносеребра и нанозолота, полуколичественный показатель «нагруженности» клеток частицами был при действии НЧ Ад в 2,6 раза значимо более высоким. Как и для легочных фагоцитов (Глава 3), эта разница может быть предположительно объяснена тем, что действие более цитотоксичных НЧ Ад вызывает более массивное разрушение макрофагов. Давно показано (Privalova L.I. et al., 1995), что продукты этого разрушения не только стимулируют компенсаторные механизмы восстановления макрофагальной популяции, но И повышают фагоцитарную активность жизнеспособной клетки.

В селезенке крыс, которым вводились наночастицы любого металла, видны немногочисленные небольшие скопления их в центре лимфоидных фолликулов. Морфометрическим показателем функционального состояния селезенки при различных стрессах может служить соотношение площадей, занимаемых на срезе белой и красной пульпой. Доля белой пульпы найдена в равной мере сниженным под влиянием обоих нанометаллов (Таблица 4.2.2).



Рисунок 4.2.1 – Печень крысы, получавшей наносеребро. Видно большое число макрофагов с частицами в расширенных синусоидах центрального отдела печеночной дольки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х200.

В почках экспериментальных животных только при действии НЧ Аg отмечено умеренное утолщение и четкое усиленное контура гломерулярных базальных мембран почечных клубочков (Рисунок 4.2.2 и для сопоставления с контрольной почкой – Рисунок 4.2.3). Эта картина весьма напоминает ту, которую можно видеть при импрегнации тканевых срезов серебром и, вероятнее всего, речь идет о своего рода суправитальном серебрении мембранных структур нефрона, связанном с фильтрацией ионов серебра, переходящих из НЧ Аg как в суспензии, так и, очевидно, *in vivo*.

Является ли эта импрегнация серебром патогенетически значимой, сказать трудно. Измерение размеров Мальпигиевых телец ни по их внешнему диаметру (т.е. по наружному листку Боуменовой капсулы), ни по диаметру сосудистого клубочка (т.е. по внутреннему листку капсулы) как раз при действии НЧ Аg не выявило каких-либо изменений, в то время как оба размера были статистически значимо увеличены при действии НЧ Аu. Для иллюстрации этого приведем

показатели, относящихся к диаметру, измеренному (в мкм) по наружному листку капсулы: в контроле 4,18±0,07, в группе НЧ Au – 4,67±0,07^{*}, в группе НЧ Ag – 4,27±0,07 (значком ^{*} отмечен показатель, отличающийся статистически значимо от контрольного, P<0.05).



Рисунок 4.2.2 – Почки крысы, получавшей наносеребро. Видны клубочки с неравномерной пролиферацией мезангиоцитов. Глобулярные базльные мембраны контурированы, с коричневатым окрашиванием. Мелкие гранулярные отложения видны в просвете канальцев, в цитоплазме клеток эпителия, в перитубулярной строме. Умеренные дистрофические изменения в эпителии канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100.



Рисунок 4.2.3 – Почки контрольной крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100.

В мезангиальных зонах почечных клубочков у животных, получавших любой нанометалл, иногда можно видеть единичные мелкие частицы коричневого или золотисто-коричневого цвета. Различной размерности частицы встречаются в эпителии извитых почечных канальцев и в их просветах.

Нельзя не отметить, что рассмотренные выше функциональные показатели не выявили явных нарушений состояния ни печени, ни почек. Вопреки бытующему мнению, структурные изменения этих органов даже на клеточном уровне оказались несколько более чувствительным индикатором токсического действия.

Судя по Кфр геномной ДНК, как НЧ Au, так и НЧ Ag обладают выраженной генотоксичностью, но при этом генотоксичность НЧ Ag заметно выше (Таблица 4.2.3). Кфр, статистически значимо повышенный по сравнению с его значением в контрольной группе, при действии НЧ Au получен только в костном мозге и почке.
Таблица	4.2.3 -	Коэффициенты	фрагментации	геномной	ДНК	крыс	после
повторны	іх внутри	ибрюшинных введ	ений наночасти	ц серебра и	ли зол	ота в д	озе 10
мг/кг, $(\overline{X_{\alpha}})$	$\overline{S_{cp} \pm S_x}$						

Ткани	Γ	руппы крыс, получавши	ие
	Воду (контроль)	НЧ Аи	НЧ Ад
Печень	0,399	0,392	0,461
	$\pm 0,001$	$\pm 0,010^{\circ}$	$\pm 0,002^{*}$
Костный мозг	0,3	0,412	0,455
	$\pm 0,003$	$\pm 0,014^{*}$	$\pm 0,032^{*}$
Селезенка	0,379	0,397	0,462
	$\pm 0,002$	$\pm 0,008^{\circ}$	$\pm 0,001^{*}$
Почки	0,385	0,422	0,42
	$\pm 0,003$	$\pm 0,009^{*}$	$\pm 0,008^*$
Ядросодержащие	0,383	0,403	0,413
клетки	$\pm 0,001$	$\pm 0,018$	$\pm 0,012^{*}$
периферической			
крови			
Скелетные	0,352	0,340	0,356
мышцы	$\pm 0,002$	$\pm 0,010$	$\pm 0,009$

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; $^{\circ}$ – с группой «НЧ Ag» (при <u>p</u> \leq 0,05 по t-критерию Стьюдента).

В то же время, при действии НЧ Ag статистически значимо повышенные значения Кфр получены во всех исследованных тканях, кроме скелетной мышцы. Если же сравнивать экспонированные к нанометаллам группы крыс между собой, то оказывается, что во всех органах, кроме почки, Кфр при действии НЧ Ag выше, чем при действии НЧ Au, причем для печени и селезенки это различие статистически значимо.

Другие исследователи в тестах *in vitro* позднее получали аналогичные различия генотоксичности этих металлов. Plotnikov E. et al. (2017) нашли, что наночастицы серебра и золота в концентрациях 0,03 мг/мл и выше вызывают повреждение ДНК лимфоцитов крови мышей, проинкубированных при 37 градусах в течение 30 минут с исследуемыми ими HЧ, причем генотоксическое действие НЧ Аg выраженнее чем НЧ Au. B работе Singh S. et al. (2011), сравнивалась генотоксичность НЧ Au и HЧ Ag на клетках человеческого гепатоцеллюлярного рака линии HepG2 и найдено, что HЧ Ag вызывают большее повреждение ДНК, чем НЧ Au.

Сопоставляя эти факты с литературными данными, обобщенными в Главе 1, можно отметить, что генотоксичность обоих нанометаллов в этой работе продемонстрирована не на изолированных клетках, а при субхроническом воздействии на целостный организм, причем продемонстрирована для ДНК клеток разных тканей. Неодинаковая выраженность генотоксического эффекта в этих тканях, вероятнее всего, объясняется: (а) неодинаковой интенсивностью митозов в них (поскольку исчезновение ядерной мембраны в процессе митоза, начиная с прометафазы и включая мета- и анафазы, делает геномную ДНК наиболее доступной контакту с повреждающим фактором); (б) неодинаковой вероятностью задержки и накопления в этих тканях наночастиц, проникающих из первичного места отложения в брюшной полости в лимфу или непосредственно в кровь. В свою очередь, вероятность вторичной длительной задержки мигрировавших НЧ в том или ином органе определяются как количественными характеристиками его перфузии и проницаемостью гисто-гематических барьеров, так И обилием клеток ретикуло-эндотелиальной системы, способных фагоцитировать эти НЧ. Тот факт, что скелетные мышцы оказались наименее восприимчивыми к генотоксическому действию наночастиц in vivo, скорее всего, объясняется их бедностью в отношении как делящихся, так и фагоцитирующих клеток.

Были измерены фактические концентрации обоих металлов только в трех тканях: печени, селезенке и почках (Таблица 4.2.4). В группах, подвергавшихся воздействию НЧ Au или НЧ Ag, соответствующие металлы были найдены в печени и селезенке в концентрациях одного порядка, хотя золота все же несколько больше, чем серебра. В то же время, в почках концентрация золота была в 26 раз больше, чем концентрация серебра. По всей вероятности, в этом органе, бедном фагоцитирющими клетками РЭС, накапливаются не столько первичные НЧ, сколько тот металл, который в ионной форме фильтруется через клубочки из крови. Менее растворимое золото отдает ионы в кровь значительно в меньшей степени, чем серебро. (Правда, по данным других исследователей, суммированным у Хлебцова Н.Г. и Дыкмана Л.А. (2011), при внутривенном

однократном введении достаточно высокой дозы частиц НЧ Au 50 нм золото в почках все же обнаруживается, но в значительно меньшей концентрации, чем в печени и селезенке).

В пользу фильтрационного механизма накопления серебра в почках говорит также обнаруженная в этом эксперименте импрегнация им гломерулярной базальной мембраны (см. выше).

Таблица 4.2.4 – Содержание золота или серебра в лиофилизированной ткани у крыс после повторных внутрибрюшинных введений соответствующих нанометаллов в дозе 10 мг/кг, мкг/г ($\overline{X_{cn}} \pm S_x$)

Группа крыс,	Ткани					
получавших	Печень	Селезенка	Почка			
Воду (контроль)	0,0017±0,0003	$0,02{\pm}0,007^+$	$0,002\pm0,0007$			
НЧ Аи	$0,20{\pm}0,02^{*\circ}$	$0,50\pm0,1^{*+}$	$0,010{\pm}0,001^{*{\circ}+}$			
НЧ Ад	0,12±0,01*	$0,40{\pm}0,04^{*+}$	$0,26\pm0,09^*$			

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль»; ° – с группой «НЧ Ag»; ⁺ – от содержания данного металла в печени (при <u>p</u> \leq 0,05 по t-критерию Стьюдента).

С другой стороны, та же самая меньшая растворимость НЧ Au по сравнению с НЧ Ag, может служить наиболее вероятной причиной большей биоперсистенции первых в печени.

Для подтверждения этой гипотезы был экспериментально исследован процесс уменьшения (от начальной величины 0,025 мг/мл) концентрации НЧ в физиологическом растворе, разбавленном водой в отношении 3:1. по поглощению света с длиной волны 400 нм. Измерения проводились в течение суток. Перед каждым измерением проводилось ультразвуковое диспергирование в течение 10 минут. Наблюдалось экспоненциальное уменьшение поглощения света с постоянными времени около 2,3 часа для НЧ Аu и 3 часа – для НЧ Аg. После 24-х часов поглощение света составляло 58 % от исходного для НЧ Au и только 11 % – для НЧ Ag, что свидетельствует о более полном исчезновении НЧ Ag за счет их растворения.

То, что концентрация металла, задерживаемого преимущественно в форме НЧ клетками РЭС, в селезенке выше, чем в печени, наблюдалось и в приведенном

выше эксперименте с НЧ Fe₃O₄. Однако, как видно из Таблицы 4.2.3, генотоксический эффект и нанозолота, и (на более высоком уровне) наносеребра в обоих органах практически одинаков. По всей вероятности, меньшее накопление металла в печени «перевешивается» более высокой регенеративной активностью этого органа.

С теоретических позиций важно, что при сопоставимых размерах и условиях воздействия НЧ Ад оказались по генотоксичности для всех тканей (как и по цитотоксичности для легочных фагоцитирующих клеток) существенно более био-активным, чем НЧ Аи. Между тем, рассмотренные в Главе 3 результаты электронно-микроскопического исследования свидетельствуют о том, что к проникновению внутрь ядра фагоцитирующих клеток *in vivo* НЧ Au оказались намного более способными, чем НЧ Ад (возможно, вследствие более выраженной склонности последних к внутриклеточной агрегации). Этот кажущийся парадокс можно рассматривать как косвенный аргумент в пользу того распространенного взгляда, что генотоксичность нанометаллов связана с повреждением ДНК кислородными свободными радикалами, проникающими в ядро из цитоплазмы, в основном, из митохондрий, обусловливающих их генерацию при действии НЧ Ад (оксидативный стресс). Накопление наночастиц в митохондриях, и повреждение митохондриальных мембран и крист при действии НЧ Ад выражены значительно сильнее, чем при действии НЧ Аи по данным этой же электронной микроскопии. Соответствие между накоплением ультратонких частиц атмосферной пыли в митохондриях и проявлениями оксидативного стресса обнаруживал Li N. et al. (2008) в экспериментах на клетках *in vitro*.

4.3 Подходы к обоснованию ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) металлсодержащих наночастиц

С позиций гигиенического нормирования, данные, представленные в Главе 3, представляют особый интерес потому, что позволяют критически пересмотреть ранее распространенные представления о якобы беззащитности организма по отношению к вредному действию НЧ. Показано, что реакция легочного фагоцитоза, (альвеолярного) являющаяся ключевым физиологическим механизмом защиты от любых частиц, отлагающихся в глубоких дыхательных путях, по отношению НЧ не только не менее, но даже существенно более активна, чем по отношению к частицам микрометрового диапазона. Этот вывод вытекает проведенных экспериментов со всеми изученными нанонезависимо ИЗ материлами, и может, по всей вероятности, считаться достаточно общей закономерностью.

Следовательно, в принципе возможны такие низкие уровни отложения НЧ в легких, с которыми организм в состоянии справиться без уловимого вреда, то есть задача установления допустимых экспозиций к наноматериалам не противоречит общей концепции гигиенического нормирования допустимых концентраций вредных веществ, например, в воздухе рабочей зоны.

Вместе с тем, при равных массовых дозах наночастицы обладают в той или иной степени более выраженной биологической агрессивностью, чем даже мельчайшие частицы микрометрового диапазона. Этим подтверждается та преобладающая точка зрениия, что при контроле масс-объемных концентраций в воздухе рабочих помещений ПДК или ОБУВ для всех НЧ должна быть более низком обычной установлена на значительно уровне, чем для (полидисперсной) пыли, в которой преобладающая доля массы обычно приходится на частиц, измеряемые микрометрами.

Количественная оценка того, во сколько раз наночастицы «вреднее» соответствующих микрочастиц, неизбежно связана с неопределенностями и зависит как от конкретного размера тех и других, так и от того, по какому конкретному вредному эффекту сопоставляется сила их действия. Не случайно ни в одной стране, в которой предложены понижающие коэффициенты для нормативов НЧ при переходе от нормативов для полидисперсной пыли какоголибо научного обоснования конкретной величины таких коэффициентов (как правило, дающих снижение норматива приблизительно на один порядок), не дается. По сути дела, речь идет о частном случае применения «принципа предосторожности» (the precautionary principle), что при современном развитии нанотоксикологии должно быть признано вполне оправданным.

Учитывая заведомо ориентировочный характер вышеизложенных подходов к обоснованию безопасных уровней воздействия НЧ, в рамках российской системы гигиенического нормирования им могут соответствовать нормативы не ПДК, а ОБУВ, даже несмотря на то, что вышеприведенные материалы дают более глубокую оценку свойств изученных НЧ, чем это обычно признается достаточным для обоснования ОБУВ.

При этом, в пределах нанометрового диапазона зависимость между диаметром и резорбтивной токсичностью частиц неоднозначна, что может быть связано с разнонаправленными различиями токсикокинетики, которую контролируют сложно взаимодействующие физиологические и физические механизмы. Поэтому пока нет достаточных оснований для того, чтобы и в пределах этого диапазона устанавливать неодинаковые гигиенические нормативы для частиц разного наноразмера.

Международная практика нормирования наноматериалов в воздухе рабочих помещений согласуется с этим постулатом, поскольку нормативы устанавливаются без какого-либо иного ограничения, кроме общепринятой условной верхней границы 100 нм, и без дифференцированно нормирования для НЧ разного размера в пределах условного нанометрового диапазона. Такова, например, пересмотренная американским National Institute of Occupational Safety

and Health (NIOSH) величина REL (Recommended Exposure Level) для любых HЧ диоксида титана, равная 0,3 мг/м³, что в 8 раз ниже, чем для «тонких» (т.е. микрометровых) частиц того же вещества (2,4 мг/м³) Между тем, разнообразные нано-порошки диоксида титана производятся промышленностью и поступают на мировой рынок для различного использования при существенно различающихся размерах первичных HЧ (например, одним из поставщиков - приблизительно 10 нм, 10-30 нм, \leq 50 нм).

В российских ГН 1.2.2633-10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды», имеется рубрика «Диапазон размеров частиц, нм (10-90 процентиль)» и, в частности, для норматива ОБУВ диоксида титана в воздухе рабочей зоны указан диапазон 5-50 нм. В технологических характеристиках наноматериалов подобных данных о процентильном распределении частиц по размерам, как правило, нет.

В том же документе указанный диапазон 5-50 нм дан и для наночастиц серебра (нормируемых только по ОДУ в воде), но и в этом случае применимость нормативов непонятна, поскольку многие коммерческие продукты наносеребра (т.н. коллоидного серебра) имеют размер частиц меньше, чем 5 НМ.

Обоснование ориентировочно безопасного уровня содержания наночастиц в воздухе рабочей зоны на примере магнетита, серебра и золота

Как известно, российская ПДК В воздухе рабочей зоны или соответствующие нормативы других стран установлены не для Fe₃O₄, а для пыли или дыма Fe₂O₃. Однако существенных различий токсичности этих двух оксидов железа нет. Свидетельством этого может служить следующий факт, также относящийся к установлению допустимых экспозиций: Объединенный Комитет экспертов по пищевым добавкам (Joint Expert Committee on Food Additives) Всемирной организации здравоохранения и Организации ООН по пище и сельскому хозяйству устанавливает для Fe₃O₄ и для Fe₂O₃ одну и ту же величину допустимого ежедневного потребления (Acceptable Daily Intake) железа.

Следует напомнить, что согласно документу «Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных

веществ в воздухе рабочей зоны», утвержденные Заместителем Главного Государственного санитарного врача СССР 4 ноября 1985 г. (№4000-85), ОБУВ могут устанавливаться, в частности, путем интерполяций и экстраполяций в рядах соединений, не идентичных, а *«близких* по химической структуре, физическим и химическим свойствам и характеру биологического действия». Более позднего официального документа, относящегося к принципам обоснования ОБУВ, который отменял бы эти МУ, не существует.

Поэтому в качестве исходной величины для расчета допустимого содержания НЧ Fe₃O₄ в воздухе рабочей зоны можно ориентироваться на имеющиеся нормативы для Fe₂O₃ в полидисперсном микрометрическом диапазоне.

Если сопоставить российскую среднесменную ПДК 6 мг/м³:

• с соответствующим федеральным нормативом США – PEL (Permissible Exposure Level) 10 мг/м³ (по Fe);

• с используемой в той же стране рекомендацией NIOSH - REL 5 мг/м³ (по Fe);

• с принятым в Великобритании среднесменным OEL (Occupational Exposure Limit) 5 $M\Gamma/M^3$ (по Fe),

• с принятыми в отдельных провинциях Канады OEL 5 мг/м³ для респирабельной фракции (в провинции Альберта) или 10 мг/м³ для суммарной пыли (в провинции Британская Колумбия),

- то можно видеть, что при пересчете российской ПДК (даже без выделения респирабельной фракции) на элемент железо она оказывается самой жесткой: 2 мг/м³.

Стремясь обеспечить наибольший запас безопасности, следует принять за основу расчета не только указанный российский норматив, но и самый жесткий из предложенных в других странах понижающий коэффициент для нормирования металлических НЧ, а именно 0,066. Это дает величину (по веществу без пересчета на Fe), равную 6 х 0,066 \approx 0,4 мг/м³. Можно отметить также, что эта концентрация в 12,5 раз ниже канадского норматива для респирабельной фракции пыли оксида

железа (такое сопоставление оправдано тем, что все НЧ являются респирабельными).

Для найденных более токсичным и генотоксичным НЧ Ag (по сравнрению с нанозолотом), допустимое содержание наночастиц серебра в воздухе рабочей зоны должно быть значительно (не менее, чем на порядок) ниже той величины ПДК 1 мг/м³, которая в России установлена в качестве предельно допустимой концентрации для пыли металлического серебра (1 мг/м³), т.е. 0,1 мг/м³.

Вместе с тем, в США концентрация 0,01 мг/м³, установленная федеральным агентством OSHA (Occupational Safety and Health) в качестве среднесменного PEL (permissible exposure limit) для металлического серебра в виде пыли или дыма, в настоящее время относится и к наночастицам серебра. Это представляется вполне логичным, поскольку в дыме (аэрозоле конденсации), как известно, присутстсвуют и частицы нанометрового диапазона.

Однако в России для пыли металлического серебра установлена в 100 раз менее жесткая ПДК, чем в США (1 мг/м³), и это мешает предложить для НЧ Ад американский норматив, чтобы не допустить внутренней противоречивости российской системы нормирования. Предложенная, в качестве временной величины (какой и являются все ОБУВ) вышеуказанная концентрация 0,1 мг/м³ представляется вполне адекватной.

Как известно, ПДК или ОБУВ для полидисперсной пыли золота в России (и насколько известно, в какой-либо другой стране) не установлено. Поэтому применить тот же самый понижающий подход для НЧ Аи невозможно. Однако результаты эксперимента позволяют обосновать рациональное соотношение с величинами ОБУВ для других нанометаллов, в частности, с предложенным выше ОБУВ для НЧ Аg. Следует учесть, что оба металла относятся к одной и той же 11-й группе (соотвественно, 5-го и 5-го периодов) периодической системы химических элементов Д.И.Менделеева, то есть к этому случаю вполне применима допускаемая цитированными выше Методическими указаниями возможность обоснования ОБУВ путем экстраполяции в *рядах веществ, близких по физическим и химическим свойствам*.

Было показано, что наночастицы золота значительно менее цитотоксичны и, что особенно важно, менее генотоксичны, чем наночастицы серебра. Это позволяет предложить для нанозолота хотя бы в 2 раза менее жесткий ОБУВ, чем для наносеребра, то есть 0,2 мг/м³.

Резюме

В целом, наши результаты свидетельствует в пользу представлений о существенно более высокой токсичности в нано-состоянии даже тех веществ, которые при действии на организм в форме частиц микрометрового диапазона являются относительно биологически инертными.

Однако в пределах нанометрового диапазона зависимость органо-системной токсичности ОТ размера является неоднозначной, завися ОТ взаимно переплетенных и часто противоположно направленных соотношений между собственно биологической агрессивностью конкретных НЧ, с одной стороны, и сложными механизмами, управляющими их токсикокинетикой, с другой. Судя по нашим экспериментальным данным, металлсодержащие НЧ, в равной мере стабильные в водных суспензиях, имеют далеко не одинаковую скорость растворения в модельных биологических средах, чем можно было отчасти объяснить существенные различия накопления их во внутренних органах. Таким образом, задержка и распределение металлических и металлооксидных НЧ в организме управляются как физиологическими, так и физико-химическими процессами, завися как от цитотоксичности, так и от растворимости в биосредах (присущей разным НЧ в разной степени).

Исходя из результатов исследований предлагается в качестве подхода к нормированию ориентировочно безопасного содержания различных наночастиц в воздухе рабочей зоны, понижение концентраций приблизительно на порядок, чем принятые ПДК для полидисперсных аэрозолей преимущественно микрометрового диапазона.

Однако в пределах нанодиапазона устанавливать неодинаковые гигиенические нормативы для частиц разного наноразмера пока нет достаточных оснований.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И ОКСИДА НИКЕЛЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНГАЛЯЦИОННЫХ ЭКСПОЗИЦИЯХ

Освобождением легких от отложившихся в них частиц не завершается история вредного действия наноматериалов на организм, поскольку как особая растворимость вещества в наносостоянии, так и способность прямой пенетрации наночастиц из мест первичного отложения в кровоток с последующей задержкой во внутренних органах (в особенности, богатых клетками РЭС), будучи, повидимому, важными механизмами указанного освобождения, одновременно создают предпосылки для поражения органов и систем, отдаленных от респираторного тракта. Поэтому в следующей серии экспериментов изучалась «системная» токсичность металлооксидных наночастиц железа и никеля при Подобные хронической ингаляционной экспозиции. ингаляционные эксперименты представляют особый интерес, учитывая загрязнение наноразмерными воздуха рабочих многих производств частицами мест И загрязняемого ими атмосферного воздуха населенных мест. Это связано с тем, что наноразмерные металооксидные частицы составляют, наряду с другими химическими формами железа и других металлов, большую или меньшую (в от ряда технологических параметров) пропорцию в составе зависимости образующихся аэрозолей конденсации, при пирометаллургических технологических процессах, а также при электродуговой и газовой сварке и резке (Lehnert M. et al., 2012; Ennan A.A. et al., 2013; Lewinski N. et al., 2013). Наряду с этим, наночастицы (НЧ) оксидов железа Fe₃O₄ и у-Fe₂O₃ находят важное диагностическое и терапевтическое применение в медицине в связи с особыми физическими (в частности, магнитными) свойствами и широко рекламируемой поставщиками «биосовместимостью» и даже «нетоксичностью», которая, однако

не подтверждается экспериментальными данными (Szalay B. et al., 2008; Soenen S.J. et al., 2012).

5.1. Оценка хронической ингаляционной токсичности наночастиц Fe₂O₃

Хронический ингаляционный эксперимент проводился с НЧ Fe₂O₃ при концентрации 1,14±0,01 мг/м³, 4 часа в день 5 дней в неделю на протяжении 3, 6 и 10 месяцев. Как показано на Рисунке 5.1.1.а, при сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) поликарбонатных фильтров (на которые ежедневно отбирались пробы воздуха из точек присоединения «пеналов» для крыс) обнаруживаются сферические НЧ либо единичные, либо в структуре небольших агрегатов. Те компактные агрегаты, В которых измерить ΗЧ каждую затруднительно, измерялись и учитывались в целом как одна частица, но и при таком подходе распределение частиц по размерам оказалось довольно узким и укладывалось в нанометровый диапазон при среднем (± σ) диаметре 14±4 нм (Рисунке 5.1.1.б).



Рисунок 5.1.1 – (а) Частицы, отобранные на поликарбонатный фильтр из воздуха в точке дыхания крысы (б) Кривая распределения частиц и их агрегатов по размерам, построенная при статистическом анализе результатов измерения 250 образов. СЭМ, увеличение х78 000.





Рисунок 5.1.2 – Спектры Рамановского светорассеяния веществом, собранным на фильтре, и эталонным Fe₂O₃ (по оси абсцисс волновое число в см⁻¹, по оси ординат интенсивность в произвольных единицах).

Использованные в эксперименте концентрации НЧ Fe₂O₃, близкие к 1 мг/м³, в 2,5 раза выше ранее предложенной (Глава 4) на основании сравнительного подхода величины ОБУВ для наночастиц Fe₃O₄ в воздухе рабочей зоны, равной 0,4 мг/м³, и одной из задач ингаляционного эксперимента являлась проверка того, достаточен ли запас надежности у этой величины.

Отметим продолжительность также, что максимальная нашего хронического эксперимента (10 мес.) в 2,5 раза больше той 4-месячной, которая регламентируется вышеуказанными методическими указаниями, что дает существенный надежности рассматриваемой проверки. Принимая запас продолжительность жизни крысы, равной 2-3 года (в среднем, 2,5 года, т.е. 30 месяцев), а ожидаемую продолжительность жизни современного человека в развитых странах – 80 годам, можно допустить, что 10-месячный экспозиционный период, примерно эквивалентен 27-летнему стажу во вредных условиях труда, что близко к реальности.

Как видно из данных, приведенных в Таблице 5.1.1, к последнему сроку эксперимента хоть и наблюдалось увеличение по сравнению с контролем сухой массы легких и содержания оксипролина в них как по абсолютным показателям, так и по показателям, корректированным на различия массы тела, однако все эти сдвиги невелики и статистически не значимы.

Этому вполне соответствовала и гистологическая характеристика изменений в легких и трахеобронхиальных лимфоузлах как слабовыраженных. Видимое при микроскопическом исследовании депонирование пыли в легочной ткани практически отсутствует. В просветах альвеол определяются отдельные макрофаги с железосодержащими пылевыми частицами (положительная реакция на железо при окраске по Перлсу) и только в единичных полях зрения в просветах альвеол имеются небольшие рыхлые скопления из таких же макрофагов (Рисунок 5.1.3).

Таблица 5.1.1 – Изменения массы легких и содержания оксипролина в них у крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной затравке наночастицами Fe_2O_3 в концентрации 1,14 мг/м³, ($\overline{X} \pm S_x$)

Группы	Масса сухих легких, г	Масса сухих легких на 100 г массы тела, г	Абсолютное содержание оксипролина в легких, мкг	Абсолютное содержание оксипролина в легких на 100 г массы тела, мкг
Контроль	0,30±	0,14±	2599,93±	1220,57±
(3 месяца)	0,04	0,01	324,23	146,40
HЧ Fe ₂ O ₃	0,36±	0,16±	2587,69±	1169,32±
(3 месяца)	0,04	0,02	269,93	110,53
Контроль	0,33±	0,14±	3440,36±	1413±
(10 месяцев)	0,03	0,01	483,59	208,24
HЧ Fe ₂ O ₃	0,37±	0,21±	3900,62±	1977,63±
(10 месяцев)	0,03	0,06	439,94	305,19

Отдельные макрофаги с пылевыми частицами встречаются перибронхиально или периваскулярно, но при этом отсутствуют гиперплазия и склеротические измененияперибронхиальной лимфоидной ткани.

Гистоархитектоника и аргирофильный каркас легочной ткани по сравнению с интактным контролем не изменены (Рисунок 5.1.4), плевра не утолщена. Бронхи калибра без воспалительных склеротических различного И изменений. Межальвеолярные перегородки не утолщены, аргирофильный каркас межальвеолярных перегородок составляют тонкие аргирофильные волокна, представленные в небольшом количестве. Перибронхиально имеется нежная сеть Респираторные аргирофильных волокон. тонких отделы воздушны. В лимфоидной ткани и в синусах трахеобронхиальных лимфатических узлов встречаются небольшие рыхлые скопления макрофагов с железосодержащими частицами в цитоплазме, но аргирофильный каркас лимфатических узлов не отличается существенно от контроля.



Рисунок 5.1.3 – Легкие крысы после 10-месячного ингаляционного воздействия наночастиц Fe₂O₃. Окраска по Перлсу, увеличение x200. Стрелкой указана альвеола, в просвете которой обнаруживается рыхлое скопление макрофагов, дающих положительную реакцию на железо. Легкие крысы при ингаляционном поступлении оксида железа. В просветах альвеол макрофаги с железосодержащими частицами в цитоплазме.



Рисунок 5.1.4 – Легкие крысы после 10-месячного ингаляционного воздействия наночастиц Fe₂O₃. Серебрение по Гомори, увеличение x50. Аргирофильный каркас в легочной ткани не изменен, плевра не утолщена.

По данным ЭПР-спектрометрии количественно оцениваемое накопление НЧ Fe₂O₃ в легких составило всего 13,5±4,3 мкг за 3 мес., 11,5±6,5 мкг за 6 мес. и 34,6±16,7 мкг за 10 месяцев ингаляционной экспозиции. Эти величины во много раз ниже, чем было получено в сопоставимом по дизайну эксперименте немецких авторов (Bellmann B. al., 1991), в котором крысы подвергались хроническому ингаляционном воздействию стандартной кварцевой пыли DQ12 при той же средней концентрации ~1 мг/м³. В этом случае накопление кварца в легких составило, например, за 3 и 6 мес. 207 мкг и 550 мкг, соответственно. Столь низкая задержка наночастиц не может быть объяснена ни низким первичным отложением их в глубоких дыхательных при дыхании (которое судя по имеющимся в литературе моделям этого отложения (Kolanjiyil A.V., 2013) может быть принято как равное приблизительно 52 % от массы ингалированных частиц), ни более высокой активностью фагоцитарно-обусловленного пульмонарного Таблице 5.1.2, клиренса, поскольку данные, представленные наши В свидетельствуют о том, что активность этого механизма скорее несколько выше в

случае действия кварца DQ₁₂. К тому же, судя по отношению числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов (НЛ/АМ) в БАЛЖ, испытанные HЧ Fe₂O₃ менее цитотоксичны, чем кварцевые, и, следовательно, фагоцитарный механизм самоочищения легких повреждается ими в меньшей степени.

Поэтому наиболее вероятной причиной столь низкой хронической задержки рассматриваемых НЧ является их относительно быстрое растворение в жидкой выстилке пульмонарной области, которое экспериментально моделируется кинетикой растворения в супернатанте БАЛЖ (которая подробно описана в Главе 6).

Таблица 5.1.2 — Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа, полученной у крыс через 24 часа после воздействия НЧ Fe_2O_3 в концентрации 1,14 мг/м³ или после интратрахеального введения НЧ Fe_2O_3 и кварца DQ_{12} ($\overline{X \pm S_x}$)

Рранациаа					
вещество	Bce	Альвеолярные	Нейтрофильные	НЛ/АМ	
		макрофаги (АМ)	леикоциты (пл)		
после з	авершающей з	экспозиции 3-месячно	ого ингаляционного пер	иода	
HH Fe ₂ O ₃	2,45±0,33*	1,96±0,28	0,46±0,08*	0,25±0,02*	
Контрольная	1,47±0,23	1,35±0,21	0,11±0,03	0,08±0,02	
камера	, ,	, ,	, ,	, ,	
	после интр	атрахеального введен	ния (0,3 мг в 1 мл)		
HЧ Fe ₂ O ₃	3,59±0,24* •	2,69±0,24	0,84 ±0,09*•	0,35±0,06*	
Кварц DQ ₁₂	5,22±0,32*	3,09±0,24*	2,09±0,41*	0,85±0,28*	
Вода (контроль)	2,16±0,26	2,04±0,24	0,12±0,03	0,05±0,01	

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль»; • — с группой « DQ_{12} » (при <u>p</u> $\leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Тем не менее, факт задержки исследованных НЧ в легких подтверждается электронной микроскопией (Рисунки 5.1.5 и 5.1.6).



Рисунок 5.1.5 – Альвеолоциты типа I (указаны стрелками) в легких крыс (а) после 6 мес экспозиции, увеличение х95 370 и (б) соответствующей контрольной группы, увеличение х52950. Наночастицы различимы только в случае (а). ПЭМ.



Рисунок 5.1.6 – Альвеолоциты типа II в легких крыс (а) после 6 мес экспозиции, увеличение x32010 и (б) соответствующей контрольной группы, увеличение x33160. Высокое число НЧ в случае (а). ПЭМ.

Какими бы ни были причины низкого уровня накопления НЧ Fe₂O₃ в легочной ткани, оно является доказанным фактом и вполне объясняет низкие количественные показатели развития пневмокониотического процесса.

В то же время, быстрая пенетрация наночастиц в лимфу и кровь, а также ускоренное растворение наночастиц в биологических средах должно, казалось бы, служить предпосылкой интенсивноготоксического воздействия на другие органы. Однако как оказалось, несмотря на существенное удлинение периода экспозиции по сравнению с регламентированной методологий обоснования ПДК, проявления системной токсичности были весьма незначительны и в некоторых случаях сомнительны.

Как видно из данных, приведенных в Таблице 5.1.3, даже по тем нескольким показателям, по которым во все три срока исследования отличие от контрольной величины имеет одинаковую направленность (задержка прироста массы тела, снижение числа ретикулоцитов, снижение активности щелочной фосфатазы и амилазы в сыворотке крови и сукцинатдегидрогеназы В циркулирующих лимфоцитах И повышение доли полихроматофильных эритроцитов костного мозга с микроядрами), ни в один из этих сроков указанное различие не было статистически значимым.

Таблица 5.1.3 – Показатели состояния организма крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной затравке наночастицами Fe_2O_3 в концентрации 1,14 мг/м³, через 24 часа после окончания экспозиции ($\overline{X_{cp}} \pm S_x$)

	Срок воздействия/ группа животных						
Покоролони	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев		
Показатель	Vournou	НЧ	Vournou	НЧ	Vournou	НЧ	
	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe ₂ O ₃	
Масса тела	196,1±	196,7±	194,6±	192,4±	190,4±	189,8±	
исходная, г	2,2	3,0	2,4	3,3	2,0	2,5	
Масса тела	218,0±	218,4±	242,4±	227,3±	248,9±	236,9±	
конечная, г	2,9	4,6	4,7	5,2*	3,0	3,2*	
Прирост массы							
тела, %	10,45	10,27	24,61	18,14	30,7	25,61	
СПП оок	15,24±	14,57±	13,10±	13,70±	12,87±	11,98±	
СПП, ССК.	0,7	0,43	0,52	0,67	0,69	0,44	

	Срок воздействия/ группа животных						
Π	3 ме	сяца	6 мес	сяцев	10 ме	сяцев	
Показатель	Контроль	HЧ Fe ₂ O ₃	Контроль	HЧ Fe ₂ O ₃	Контроль	HЧ Fe ₂ O ₃	
Норковый рефлекс, число							
заглядываний в норки за 3 мин	7,3± 1,11	9,8± 0,73	6,00± 0,73	$5,00\pm 0,90$	7,18± 1,19	11,05± 1,15*	
Число пересеченных	12,4±	15,45±	10,0±	11,94±	16,41±	16,68±	
квадратов за 3 мин	1,58	1,61	1,19	1,64	2,09	1,74	
Масса печени, г на	4,20±	4,11±	3,28±	3,22±	$3,05\pm 0,07$	2,99±	
100 г массы тела	0,13	0,14	0,14	0,15		0,06	
Масса почек, г на	0,64±	0,66±	0,62±	0,64±	0,67±	0,68±	
100 г массы тела	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	
Масса селезенки, г на 100 г массы тела	0,31± 0,01	0,33± 0,01	0,29± 0,00	0,28± 0,02	0,32± 0,02	0,34± 0,04	
Масса мозга, г на	0,81±	0,81±	0,73±	0,73±	0,78±	0,82±	
100 г массы тела	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01*	
Гемоглобин в	146,33±	153,00±	144,60±	139,60±	163,29±	148,84±	
крови, г/л	3,09	7,57	4,87	9,36	3,69	3,64*	
Лейкоциты,	8,50±	10,40±	7,32±	9,90±	9,25±	8,46±	
10 ³ /мкл	0,75	0,86	0,58	1,37	0,91	0,79	
Тромбоциты,	713,00±	636,17±	547,80±	607,60±	656,47±	$600,74\pm 45,87$	
10 ³ /мкл	20,32	24,27*	29,32	33,78	48,06		
Эритроциты, 10 ¹² г/л	6,39±0,17	6,67±0,34	5,95±0,26	5,91±0,35	6,85±0,19	6,61±0,18	
Ретикулоциты, ‰	19,78±	17,47±	21,91±	18,82±	26,37±	19,78±	
	2,46	3,23	2,98	3,05	3,61	2,10	
Базофилы, %	0	0	0	0	0	0	
Эозинофилы, %	1,25±	1,42±	1,60±	1,60±	3,12±	4,95±	
	0,13	0,26	0,27	0,22	0,57	0,75	
Палочкоядерные	1,00±	1,33±	1,10±	1,30±	0,24±	0,21±	
нейтрофилы, %	0.00	0.14*	0.18	0 21	0.11	0.10	
Сегментоядерные, %	11,33±	10,67±	15,40±	16,30±	29,29±	24,47±	
	0,77	0,81	1,19	1,84	2,49	1,32	

		Срок воздействия/ группа животных				
Почеловат	3 ме	сяца	6 мес	сяцев	10 ме	сяцев
показатель	IC	НЧ	IC	НЧ	IC	НЧ
	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe ₂ O ₃
Marrarra 0/	6,58±	6,92±	7,00±	7,30±	8,29±	9,00±
Моноциты, Уо	0,66	0,53	0,42	0,72	4,09	4,93
Truch array 0/	79,83±	79,67±	74,90±	73,30±	59,29±	61,37±
Лимфоциты, 70	1,05	0,93	1,80	2,39	5,87	5,09
Число клеток с						
микроядрами, на						
1000						
полихроматофиль						
ных эритроцитов	$0,63\pm$	$1,50\pm$	0,67±	$0,83\pm$	$0,80\pm$	$1,00\pm$
костного мозга	0,18	0,38	0,33	0,40	0,37	0,45
SH-группы в						
плазме крови,	14,95±	15,23±			11,32±	11,65±
ммоль/л	2,07	0,77	-	-	1,09	1,85
Каталаза в						
сыворотке крови,	$0,58\pm$	$0,60\pm$	0,57±	$0,55\pm$	0,59±	$0,63\pm$
мкмоль/л	0,02	0,01	0,01	0,02	0,07	0,08
Восстановленный						
глютатион в						
гемолизате крови,	15,65±	15,88±	26,24±	19,46±	29,22±	30,67±
мкмоль/л	2,04	1,37	4,26	1,74	4,04	2,06
Церулоплазмин в						
сыворотке крови,	74,43±	$70,85\pm$	77,68±	84,90±	97,92±	$100,89\pm$
МГ/%	3,70	4,22	3,95	6,75	6,43	6,06
МДА в сыворотке	$5,05\pm$	$4,35\pm$	4,01±	$3,99\pm$	7,65±	5,93±
крови, мкмоль/л	0,44	0,18	0,20	0,26	1,64	1,10
Активность АлАТ						
в сыворотке	77,58±	$68,07\pm$	61,88±	$70,94 \pm$	56,17±	74,55±
крови, Е/л	6,46	3,00	3,42	5,22	2,00	8,53*
Активность АсАТ						
в сыворотке	318,19±	293,72±	309,10±	331,50±	259,54±	292,96±
крови, Е/л	22,07	15,93	16,63	26,58	15,97	26,18
Коэф де Ритиса	4,18±	4,32±	5,03±	4,73±	4,61±	4,10±
Коэф. де і итией	0,22	0,16	0,18	0,27	0,21	0,30
Щелочная						
фосфатаза в						
сыворотке крови,	138,60±	126,80±	88,68±	85,02±	82,71±	76,26±
Е/л	12,24	10,36	8,18	6,92	13,64	6,88
ГГТП в сыворотке	10,33±	11,03±	11,04±	13,76±	16,79±	16,46±
крови, Е/л	1,60	0,94	1,27	1,66	5,13	3,16
Общий белок в	-1.40	(0, 6)	(0.05	60 - 2		
сыворотке крови,	71,19±	69,21±	69,83±	69,79±	78,62±	75,39±
г/л	1,69	1,32	2,04	2,58	1,65	1,55

	Срок воздействия/ группа животных						
Памаратат	3 ме	сяца	6 мес	сяцев	10 месяцев		
Показатель	Контроль	HЧ Fe ₂ O ₃	Контроль	HЧ Fe ₂ O ₃	Контроль	HЧ Fe ₂ O ₃	
Альбумин в							
сыворотке крови,	45,99±	45,19±	$38,80\pm$	$37,68\pm$	42,38±	41,65±	
г/л	1,23	0,84	1,05	1,25	1,74	0,93	
Глобулины в							
сыворотке крови,	25,20±	24,02±	31,03±	32,11±	36,24±	33,74±	
г/л	1,04	1,04	1,24	1,64	1,55	1,34	
Альбумин-							
глобулиновый	$1,84\pm$	$0,65\pm$	1,26±	1,19±	1,20±	$1,25\pm$	
индекс	0,08	0,01*	0,04	0,05	0,09	0,06	
Мочевая кислота в							
сыворотке крови,	114,25±	$98,25\pm$	$106,80\pm$	$115,00\pm$	$101,22\pm$	$109,82\pm$	
мкмоль/л	9,92	6,31	5,08	7,82	12,08	13,25	
Мочевина в							
сыворотке крови,	5,81±	5,83±	$3,45\pm$	3,77±	5,53±	5,23±	
ммоль/л	0,41	0,48	0,18	0,31	0,35	0,67	
Билирубин в							
сыворотке крови	1,69±	1,71±	1,76±	2,19±	2,76±	2,78±	
мкмоль/л	0,15	0,11	0,07	0,15*	0,33	0,17	
Креатинин в							
сыворотке крови	49,06±	47,84±	$47,83\pm$	49,40±	61,62±	55,83±	
мкмоль/л	2,38	2,35	1,97	1,91	8,72	5,61	
Глюкоза, в							
сыворотке крови	6,85±	7,19±	6,67±	7,01±	6,66±	$6,65\pm$	
ммоль/л	0,33	0,29	0,26	0,24	0,27	0,21	
Амилаза в							
сыворотке крови,	5187,6±	5219,1±	4949,5±	6279,8±	2826,1±	3042,6±	
Е/л	578,4	736,5	349,7	679,3	378,2	342,1	
Железо в							
сыворотке крови,	55,23±	$56,43\pm$	49,32±	$55,63\pm$			
мкмоль/л	3,98	4,49	4,17	4,27	-	-	
Железосвязывающ							
ая способность в							
сыворотке крови,	41,64±	$40,61\pm$	41,43±	48,66±			
мкмоль/л	7,64	2,90	5,15	3,18	-	-	
Активность СДГ,							
число гранул							
формазана в 50	517,58±	456,92±	573,75±	$536,60 \pm$	620,94±	606,78±	
лимфоцитах крови	16,36	9,95	24,40	22,19	19,15	19,17	
Суточный объем	34,30±	29,85±	39,94±	40,17±	42,65±	39,05±	
мочи мп	1,82	1,36*	3,37	2,29	1,84	2,77	
Копропорфирин в	73,54±	57,39±	41,98±	42,48±	38,90±	59,94±	
моче, нмоль/л	12,11	8,71	5,87	6,69	6,90	8,84	

	Срок воздействия/ группа животных							
Показатони	3 ме	сяца	6 мес	6 месяцев		10 месяцев		
ПОказатель	Vournou	НЧ	Vournou	НЧ	Контрони	НЧ		
	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe ₂ O ₃		
Дельта-АЛК в	5,71±	5,67±	5,53±	5,61±	9,01±	8,92±		
моче, мкг/мл	0,47	0,46	0,65	0,83	1,45	1,51		
Дельта-АЛК,	0,18±	0,20±	0,18±	0,14±	0,22±	0,28±		
мкг/мл*сутки	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,06		
Креатинин в моче,	0,96±	1,06±	0,85±	0,82±	1,02±	1,05±		
ммоль/л	0,03	0,04	0,06	0,03	0,05	0,05		
Манарина р мана								
мочевина в моче,	122,27±	$126,62 \pm$	$102,43\pm$	100,18±	$101,31\pm$	112,54±		
ММОЛЬ/Л	6,76	5,4	3,13	4,64	5,90	6,34		

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0,05$ по tкритерию Стьюдента с поправкой Бонферони).

Что же касается тех немногих показателей, по которым отличие от контроля оказывалось статистически значимым, то и по ним оно имело место только в один какой-нибудь срок и к тому же не было однонаправленным. Кроме того, трактовка некоторых из таких статистически значимых сдвигов вызывает обоснованные сомнения. Так, например, с позиций критерия вредности затруднительно определить значение выявленного в конце эксперимента статистически значимого повышения числа заглядываний в норки. Как известно, так называемый норковый рефлекс является выработанным эволюцией элементом исследовательского поведения крысы. При том, что в данном случае не было ни повышения общей двигательной активности животных (оцениваемой числом пересеченных квадратов доски), ни преобладания процессов возбуждения над процессами торможения в ц.н.с. (судя по суммационно-пороговому показателю), такое обособленное повышение исследовательской активности скорее кажется положительным, чем отрицательным сдвигом (если оно вообще не случайно, несмотря на малую, но не нулевую вероятность случайности). Можно отметить также, что в большом числе токсикологических экспериментов, наблюдается снижение этого показателя.

Статистически значимое различие между опытом и контролем по содержанию гемоглобина в крови в 10-месячный срок отражает не столько

снижение этого показателя в экспонированной группе (в которой оно по сравнению с предыдущим сроком даже несколько повысилось) сколько его выраженное повышение в контрольной. Число тромбоцитов в крови было значимо снижено только в первый срок эксперимента и опять-таки отражает наблюдавшийся только в этот срок высокий контрольный уровень, в то время как в экспонированной группе он был даже более высоким, чем в последующем. Активность сывороточной аланин-аминотрансферазы, напротив, нарастала в экспонированной группе от срока к сроку, но в контрольной так же последовательно снижалась, так что в этом случае статистически значимое отличие опыта от контроля в 10-месячный срок, возможно, заслуживает большего Однако одному другому сывороточному внимания. ΗИ ПО показателю гепатотоксического эффекта он не подтверждается.



Рисунок 5.1.7 – Продольное сечение нервного волокна в ольфакторной зоне головного мозга крысы после 10 месячной ингаляционной экспозиции. Очаговое повреждение миелиновой оболочки (отмеченное звездочками) связано с накоплением наночастиц (отмечено стрелкой). ПЭМ, увеличение x49 920.



Рисунок 5.1.8 – Наночастицы в цитоплазме отростков нейронов и в области мебран и межмембранного пространства митохондрий. ПЭМ, увеличение x48 630.

Небольшое увеличение массового коэффициента головного мозга к концу эксперимента, возможно, связано с хорошо известным фактом проникновения в мозг по волокнам ольфакторного нерва тех наночастиц, которые при ингаляции в немалом числе отлагаются в носовых ходах (Oberdörster G. et al.; 2014, Elder A. et al., 2006; Kao Y.Y. et al., 2012 и др.). В нашем эксперименте немногочисленные очаги наночастиц действительно обнаруживались в миелиновой оболочке внутримозговых нервных волокон наряду с ее очаговым расслоением (Рисунки 5.1.7 и 5.1.8), а в цитоплазме отростков нейронов, обращают на себя внимание частицы, локализующиеся в области мембран и межмембранного пространства митохондрий.

Однако накопление в головном мозге, рассматриваемом как единый орган, столь невелико, что не могло быть уловлено ЭПР-спектрометрией. Низкая интенсивность токсических изменений может быть связана с тем, что, судя по данным ЭПР-спектроскопии хроническая задержка НЧ Fe₂O₃ во внутренних органах, как и в легких, оказалась очень невысокой.

Орган	Время ингаляционной экспозиции									
	3 N	мес	6 1	мес	10 мес					
	Vaumpaur	НЧ	Vaumpaur	НЧ	Vaumpau	HЧ Fe2O3				
	контроль	Fe ₂ O ₃	контроль	Fe2O3	контроль					
Печень 0,41 0,00	0,417969 <u>+</u>	0,422847 <u>+</u>	0,4175 <u>+</u>	0,4235 <u>+</u>	0,417417 <u>+</u>	0,424502 <u>+</u>				
	0,0002718	0,0005175*	0,000369	0,0003474*	0,000342	0,000566*				
Костный	0,399 <u>+</u>	0,403895+	0,399583+	0,4047	0,398167	0,404269+				
мозг	0,000532	0,0005175*	0,000507	<u>+</u> 0,000555*	<u>+</u> 0,000572	0,00053*				

Таблица 5.1.4 — Коэффициент фрагментации геномной ДНК в печеночных и костномозговых клетках крыс крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной затравке наночастицами Fe₂O₃ в концентрации 1,14 мг/м³, ($\overline{X \pm S_x}$)

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Остается, таким образом, только один статистически значимый сдвиг по сравнению с контролем, мимо которого, не следует пройти, а именно небольшое увеличение коэффициента фрагментации геномной ДНК. С одной стороны, повышение этого показателя, как в печени, так и костном мозге наблюдалось только при его вычислении не менее, чем до 3-го десятичного знака, однако было статистически значимым во всех сроках эксперимента, с другой, при округлении его до 2-го знака (что соответствует наиболее принятому в научной литературе выражению т.н. индекса ДНК-фрагментации в процентах) какие бы то ни было межгрупповые различия, отсутствовали (Таблица 5.1.1).

Генотоксичность HЧ Fe_2O_3 неоднозначна и по литературным данным. Многие исследователи не находят никаких проявлений его генотоксического действия как в экспериментах *in vitro* с различными культурами клеток (Freyria F.S. et al., 2012; Karlsson H.L. et al., 2008; Karlsson H.L. et al., 2009), так и *in vivo* (Singh S.P. et al., 2013).

При обзоре литературы были найдены только два положительных результата при оценке генотоксического/мутагенного действия НЧ Fe_2O_3 один *in vitro* (Bhattacharya K. et al., 2009) и один *in vivo* (Song M.F. et al., 2012). Bhattacharya K. et al. (2009) нашли, что при взаимодействии НЧ Fe_2O_3 50 нм в концентрациях 2, 5,10 и 50 мкг/мл с культурами человеческих легочных

фибробластов (IMR 90) и клетками эпителия легких (BEAS-2B) через 24 часа при воздействии концентраций 10 мкг/мл были зарегистрированы нарушение в ДНК клетках эпителия легких, оцененные в тесте Comet assay, при концентрации 50 мкг/мл в обоих типах изучаемых клеточных культур (Bhattacharya K. et al., 2009). Song M.F. et al. (2012), обнаружили статистически значимое увеличение количества микроядер в ретикулоцитах периферической крови мышей самок через 72 часа после внутрибрюшинного введения НЧ Fe_2O_3 в дозах 1 мг/мышь и 3 мг/мышь, (при средней массе тела мыши, равной ~ 25 г), доза составила 40 мг/кг и 120 мг/кг соответственно (Song M.F. et al., 2012). Необходимо отметить, что этот мутагенный эффект был найден на относительно высоком уровне доз.

В нашем эксперименте кумулятивная масса наночастиц, первично отложившихся в глубоких дыхательных путях крысы за первые 3 месяца (т.е. 65 рабочих дней) ингаляционного периода, может быть оценена величиной:

1,14 мг/м³ х 10⁻⁴ м³ / мин х 240 мин х 65 х 0,52 = 0,92 мг, что при средней массе тела крыс, равной ~ 250 г составляет дозу 3,7 мг/кг.

Эти результаты (как литературные, так и наш собственный), особо важны в связи с тем, что электродуговая сварка, в том числе так называемых мягких (т.е. не легированных) сталей признана на основании большого числа онкоэпидемиологических данных производственным процессом, вызывающим развитие рака у человека (СанПиН 1.2.2353-08, 2008).

В составе сварочного аэрозоля преобладает субмикронная, в т.ч. нанометровая фракция Fe_2O_3 – вещества, не обладающего канцерогенностью в микрометровом диапазоне. Генотоксичность НЧ Fe_2O_3 при хроническом ингаляционном воздействии даже в относительно невысокой концентрации может рассматриваться как объяснение канцерогенности сварочного аэрозоля даже при отсутствии в его составе таких облигатных канцерогенов, как хром, никель и др.

С практических позиций регуляторной токсикологии и оценки рисков для здоровья, обусловленных воздействием наноматериалов, принципиально важно то, что для НЧ генотоксичность *in vivo* манифестируется при таком низком уровне экспозиции, при котором их системное токсическое действие на организменном уровне еще не выражено. По-видимому, для определенных наноматериалов не столько системная токсичность, сколько генотоксичность (и тем самым – вероятная канцерогенность) должна рассматриваться как лимитирующий риск.

В целом же, полученные экспериментальные результаты в совокупности с методическими соображениями, представленными при их обсуждении, позволит расценить среднюю за полный период экспозиции концентрацию 1,14 мг/м³, как пороговую при хроническом ингаляционном воздействии (Lim_{ch}) в том значении этого термина, который принят в отечественной профилактической токсикологии.

В соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» так называемый коэффициент запаса, служащий для перехода от пороговой к предельно допустимой концентрации, обычно устанавливается в пределах от 3 до 20. Следует учесть, что по абсолютному большинству эффектов испытанная концентрация является фактически не действующей. Кроме того, 2,5-кратное удлинение экспериментального периода по сравнению с предусмотренным этими МУ само по себе вносит значительный запас надежности в оценку величины Lim_{ch}. По этим двум соображениям, принимается величина коэффициента запаса $\approx 2,9$, близкая к указанной минимальной, и тем самым, предложенный к утверждению норматив среднесменной ПДК в воздухе рабочей зоны как для дижелеза триоксида (Fe₂O₃) в форме наночастиц составляет 0,4 мг/м³.

Эта величина в 15 раз ниже среднесменной ПДК 6 мг/м³, установленной в ГН 2.2.5.1313-03 для того же вещества в обычной форме, и можно отметить, что снижение действующих нормативов на один-полтора порядка при установлении допустимых уровней экспозиции для металлических и металлооксидных наночастиц соответствует международной практике. Это предложение было принято Роспотребнадзором, и в ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 13.02.2018 внесена следующая формулировка среднесменная конуентрация «диЖелезо триоксид наночастицы» 0,4 мг/м³.

5.2. Оценка хронической ингаляционной токсичности наночастиц NiO

Следующий ингаляционный эксперимент был проведен с НЧ NiO.

Химическая идентичность НЧ как NiO была так же подтверждена с помощью Рамановской спектроскопии (Рисунок 5.2.1). Средний размер частиц составлял 23±5 нм (Рисунок 5.2.2)



Рисунок 5.2.1 – Спектры комбинационного рассеяния для наночастиц на фильтрах соответствуют NiO



Рисунок 5.2.2 – а) Наночастицы NiO на фильтрах, (сканирующая электронная микроскопия. и б) функция распределения частиц по диаметру. СЭМ, увеличение x50 000.

Токсичность НЧ NiO изучена экспериментально в ряде исследований, но в основном, на клеточных культурах и мелких водных организмах (Прощенко Д.А., 2016; Ates M. et al., 2016; Gonga N. et al., 2016; Latvala S. et al., 2016; Minigalieva I.A. et al., 2017; Sousa C.A. et al., 2018).

Публикуемые до самого последнего времени экспериментальные данные об ингаляционной токсичности НЧ NiO получены при не слишком длительных экспозициях (Oyabu T. et al., 2007; Ogami A. et al., 2009; Morimoto Y. et al., 2009; Zaitseva N.V. et al., 2016; Chang X.H. et al., 2016; Oyabu T. et al., 2017), не соизмеримых даже в масштабах короткой жизни крысы с периодом возможных производственных экспозиций, которые прежде всего и интересны в области профилактической промышленной токсикологии.

Исходя именно из этих соображений, был запланирован хронический ингаляционный эксперимент, рассчитанный на продолжительность от 3 до 10 месяцев, предполагая осуществить его при средней концентрации NiO-NP во $M\Gamma/M^3$. вдыхаемом крысой воздухе порядка $1,0\pm0,12$ Эта экспозиция представлялась весьма умеренной с учетом позиции регуляторной токсикологии по отношению к металлическому никелю и его водо-нерастворимым соединениям в воздухе рабочего помещения, для которых, например, в США установлен the OSHA PEL равный как раз 1 мг/м³ (как концентрация, средневзвешенная по времени). Исходя из того, что любое химическое соединение никеля, вероятно, токсичнее по сравнению с соединениями железа, ожидалось, что для наноразмерных никель-оксидных частиц эта концентрация окажется не безвредной, а еще более токсикологически эффективной, чем для испытанных в аналогичном хроническом ингаляционном эксперименте (смотри выше) наночастиц оксида железа Fe₂O₃ в близкой концентрации (1,14±0,01 мг/м³). Вместе с тем, предполагалось, ЧТО противоположную роль В качестве детерминанты сравнительной токсичности этих двух металлооксидных наночастиц сыграет почти вдвое больший диаметр NiO-NP (23±5 нм) по сравнению с Fe₂O₃-NP (14±4 нм).

Ожидание существенной токсичности назначенной концентрации никельоксидных наночастиц неожиданно не только сбылось, но и оказалось намного превзойденным, так что уже после первых 1-2 экспозиций клиническая картина острой интоксикации явно угрожала тем, что животные (очень вялые, снизившие на 30 % потребление корма) не доживут до развития хронической. Было поэтому решено прервать этот эксперимент после всего 5 экспозиций и начать новый при концентрации НЧ NiO, сниженной в 4-5 раз.

Однако было целесообразным провести у этих крыс измерение хотя бы части тех показателей, которые были намечены дизайном хронического эксперимента с тем, чтобы использовать их в качестве своего рода предикторов результатов второго. Это позволяет рассматривать первый ингаляционный эксперимент не как просто неудачный, а как пилотный.

Пятикратная экспозиция НЧ NiO в концентрации 1 мг/м³ приводила к изменению некоторых показателей состояния организма экспериментальных животных: увеличение массы печени; повышенный релиз лактатдегидрогеназы в кровь; лейкоцитоз; системное торможение окислительно-восстановительного энергообмена, интегральным цитохимическим показателем которого является снижение активности сукцинат дегидрогеназы в лимфоцитах крови; усиление перекисного окисления липидов, судя по повышению концентрации малонового диальдегида в крови; увеличение числа эритроцитов, ширины распределения эритроцитов, показателя гематокрита и содержания гемоглобина в крови.

Таблица 5.2.1 – Показатели состояния организма крыс, подвергавшихся 5-кратни	ой
ингаляционной затравке наночастицами NiO в концентрации 1 мг/м ³ , ($\overline{X\pm}S_x$)	

Показатели	Через 24 часа после экспозиции	
	Контроль	НЧ NiO
Масса тела после затравки, г	$255,63 \pm 3,71$	$247,50 \pm 3,56$
Масса печени, г на 100 г массы тела	$3,12 \pm 0,05$	$3,41 \pm 0,07*$
Масса почек, г на 100 г массы тела	$0,66 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,01$
Масса селезенки, г на 100 г массы тела	$0,24 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
Масса мозга, г на 100 г массы тела	$0,75 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,01$

Лейкоциты, 10 ⁶ /мл	$8,68 \pm 0,62$	$10,94 \pm 0,64*$
Эритроциты, 10 ¹² /мл	$6,92 \pm 0,13$	$7,33 \pm 0,14*$
Гемоглобин, г/л	$146,00 \pm 2,30$	$154,42 \pm 2,09*$
Гематокрит, %	$41,32 \pm 0,62$	$43,32 \pm 0,62*$
Ширина распределения эритроцитов, %	$14,24 \pm 0,18$	$15,12 \pm 0,19*$
Тромбоциты, 10 ⁶ /мл	934,75 ± 36,75	965,25 ± 21,64
SH-группы в плазме крови, ммоль/л	$1,28 \pm 0,12$	$1,14 \pm 0,20$
Каталаза в сыворотке крови, мкмоль/л	$1,87 \pm 0,16$	$2,03 \pm 0,14$
Восстановленный глютатион в		
гемолизате крови, мкмоль/л	$12,22 \pm 0,56$	$12,40 \pm 0,57$
Церулоплазмин в сыворотке крови,		
мг/%	$92,58 \pm 6,68$	$99,52 \pm 5,30$
МДА в сыворотке крови, мкмоль/л		
	$5,72 \pm 0,37$	8,140 ± 1,09*
Активность АлАТ в сыворотке крови,		
Е/л	$61,58 \pm 3,21$	$61,11 \pm 3,63$
Активность AcAT в сыворотке крови,		
Е/л	$153,65 \pm 14,50$	$157,03 \pm 10,74$
Коэф. де Ритиса	$2,58 \pm 0,25$	$2,88 \pm 0,25$
Общий белок в сыворотке крови, г/л	$77,01 \pm 0,97$	$76,36 \pm 1,32$
Мочевина в сыворотке крови, ммоль/л	$5,85 \pm 0,40$	$4,80 \pm 0,16*$
Креатинин в сыворотке крови мкмоль/л		
	$36,74 \pm 1,50$	34,57 ± 1,10
ЛДГ, Е/л	$1665, 13 \pm 273, 57$	$2663,00 \pm 360,17*$
Активность СДГ, количество гранул		
формазана в 50 лимфоцитах	$800,25 \pm 36,65$	553,88 ± 10,10*

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль» (при *p*≤0,05 по *t*-критерию Стьюдента).

Содержание в крови ретикулоцитов после окончания экспозиции через 24 часа статистически значимо увеличивалось, через неделю после воздействия их содержание снижалось, но оставалось достоверно выше, чем в контрольной группе (Таблица 5.2.2).

Таблица 5.2.2 – Содержание ретикулоцитов в эритроцитах периферической крови крыс, подвергавшихся 5-кратной ингаляционной затравке HЧ NiO в концентрации 1 мг/м³, ‰, ($\overline{X} \pm S_x$)

Через 24 часа после экспозиции		Через 7 суток после экспозиции		
Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	
$19,01 \pm 1,58$	46,43 ± 3,14*	$15,22 \pm 1,37$	25,86 ± 3,88*•	

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «НЧ NiO через 24 часа после экспозиции» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

При анализе общетоксического действия через 3, 6 и 10 месяцев ингаляции НЧ NiO в концентрации 0,23 мг/м³ некоторые показатели состояния организма, которые представлены в Таблице 5.2.3, отличались статистически значимо от соответствующего показателя контрольной группы.

Таблица 5.2.3 – Показатели состояния организма крыс, подвергавшихся ингаляционной затравке наночастицами NiO в концентрации 0,23 мг/м³, через 24 часа после окончания экспозиции ($\overline{X \pm S_x}$)

Показатели	Время экспозиции					
	3 ме	сяца	6 месяцев		10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	HЧ NiO
Масса тела до	241,2±	230,1±	249,1±	248,5±	232,9±	230,6±
затравки, г	9,2	4,9	42	5,1	4,1	3,6
Масса тела после	275,4 ±	$262,5 \pm$	$282,88 \pm$	$290,25 \pm$	$287,92 \pm$	$275,26 \pm$
затравки, г	8,5	4,8	6,01	4,88	4,37	7,57
Прирост массы тела	15,2±	14,4±	13,7±	17,4±	25,1±	17,2±
в %	3,9	2,3	2,3	2,7	2,8	1,7*
СПП, сек	$11,02 \pm$	$10,53 \pm$	$12,67 \pm$	$11,31 \pm$	$11,39 \pm$	$10,87 \pm$
	0,74	0,47	0,94	0,68	0,82	0,74
Тест «открытое	5,83 ±	5,58 ±	$6,19 \pm 0,84$	5,88 ±	$7,00 \pm 1,21$	8,83 ±
поле» число	1,09	1,11		0,93		1,13
заглядываний в						
норки за 3 мин.						
Масса легких, г на	0,87 ±	1,23 ±	$0,69 \pm 0,06$	0,93 ±	$1,16 \pm 0,09$	1,61 ±
100 г массы тела	0,09	0,10 *		0,08 *		0,12 *
Масса печени, г на	3,24 ±	3,52 ±	$3,71 \pm 0,16$	3,61 ±	$3,44 \pm 0,10$	3,41 ±
100 г массы тела	0,14	0,13		0,12		0,09
Масса почек, г на	0,63 ±	0,64 ±	$0,65 \pm 0,02$	0,69 ±	$0,62 \pm 0,02$	0,67 ±
100 г массы тела	0,02	0,02		0,02		0,02 *
Масса селезенки, г	0,21 ±	0,22 ±	$0,30 \pm 0,06$	0,24 ±	$0,21 \pm 0,01$	0,25 ±
на 100 г массы тела	0,01	0,02		0,01		0,02
Масса мозга, г на	$0,70 \pm$	$0,75 \pm$	$0,72 \pm 0,02$	0,71 ±	$0,69 \pm 0,02$	0,73 ±
100 г массы тела	0,04	0,02		0,02		0,02

Показатели	Время экспозиции					
	3 ме	сяца	6 месяцев 10 месяцев			сяцев
	Контроль	HЧ NiO	Контроль	HЧ NiO	Контроль	HЧ NiO
Эритроциты, 10 ¹² /мл	6,37 ±	$7,08 \pm$	$7,23 \pm 0,11$	6,94 ±	$6,92 \pm 0,24$	6,75 ±
	0,22	0,17 *		0,12		0,08
Гемоглобин, г/л	$141,3 \pm$	$158,2 \pm$	$152,8 \pm 1,8$	151,1 ±	$151,5 \pm 3,8$	$154,7 \pm$
	3,5	2,8 *		2,1		2,2
Гематокрит, %	37,18 ±	41,56 ±	43,28 ±	43,18 ±	39,94 ±	$39,22 \pm$
	1,16	0,86 *	0,58	0,66	1,22	0,84
Средний объем	$58,23 \pm$	58,83 ±	59,90 ±	62,24 ±	57,85 ±	$59,05 \pm$
эритроцита, мкм ³	0,65	0,58	0,57	0,57 *	0,90	0,44
Ширина	$13,56 \pm$	$14,04 \pm$	$13,06 \pm$	13,82 ±	$13,01 \pm$	$13,64 \pm$
распределения	0,18	0,09*	0,15	0,18*	0,26	0,13*
эритроцитов, %						
Тромбоциты, 10 ⁶ /мл	728,50 ±	844,17 ±	797,63 ±	$759,60 \pm$	703,50 ±	792,53 ±
-	86,73	52,33	32,97	33,45	58,98	27,24
Лейкоциты, 106/мл	6,93 ±	$6,00 \pm$	$5,79 \pm 0,42$	$5,68 \pm$	$5,62 \pm 0,27$	6,36 ±
	0,61	0,45		0,33		0,38*
Тромбокрит, %	0,22 ±	0,25 ±	$0,26 \pm 0,01$	0,24 ±	$0,19 \pm 0,02$	0,22 ±
	0,02	0,01		0,01		0,01
Базофилы, %	$0,00 \pm$	$0,00 \pm$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm$
	0,00	0,00		0,00		0,00
Эозинофилы, %	4,33 ±	2,11 ±	$4,69 \pm 0,51$	5,00 ±	$3,94 \pm 0,78$	3,61 ±
	1,00	0,39		0,73		0,56
Палочкоядерные	$1,44 \pm$	$1,44 \pm$	$1,00 \pm 0,00$	$1,40 \pm$	$0,94 \pm 0,06$	$1,22 \pm$
нейтрофилы, %	0,18	0,24		0,16 *		0,10 *
Сегментоядерные	$21,56 \pm$	$22,11 \pm$	$26,44 \pm$	$28,33 \pm$	$29,88 \pm$	$30,28 \pm$
нейтрофилы, %	1,02	0,82	1,24	1,04	2,21	1,60
Моноциты, %	$6,00 \pm$	5,22 ±	$4,69 \pm 0,33$	$4,07 \pm$	$5,81 \pm 0,44$	$7,67 \pm$
	0,41	0,36		0,34		1,51
Лимфоциты, %	$66,67 \pm$	69,11 ±	$63,19 \pm$	$61,20 \pm$	$53,19 \pm$	$57,22 \pm$
	1,27	1,05	1,20	1,10	3,78	0,89
Содержание	$11,92 \pm$	$16,75 \pm$	$13,73 \pm$	$20,39 \pm$	$12,55 \pm$	$15,89 \pm$
ретикулоцитов в	1,28	1,39*	1,28	1,56*	0,86	0,62*
периферической						
крови, ‰						
SH-группы в плазме	$10,19 \pm$	$10,82 \pm$	$6,67 \pm 0,26$	$6,07 \pm$	$3,52 \pm 0,68$	4,31 ±
крови, ммоль/л	0,53	0,68		0,95		0,58
Восстановленный	31,15 ±	24,40 ±	$18,36 \pm$	$18,67 \pm$	24,91 ±	21,12 ±
глютатион в	3,63	3,83	1,80	3,96	1,73	0,85
гемолизате крови,						
мкмоль/л						
Каталаза в	0,15 ±	0,11 ±	$0,54 \pm \overline{0,03}$	$0,56 \pm$	$0,55 \pm \overline{0,06}$	$0,60 \pm$
сыворотке крови,	0,03	0,02		0,03		0,02
мкмоль/л						
Показатели	Время экспозиции					
-------------------	---------------------------------------	--------------	-----------------	--------------	-----------------	---------------
	3 мес	сяца	6 мес	яцев	10 мес	сяцев
	Контроль	HЧ NiO	Контроль	HЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
МДА в сыворотке	5,17 ±	$3,97 \pm$	$5,07 \pm 0,38$	5,74 ±	$5,56 \pm 0,72$	7,84 ±
крови	0,39	0,31 *		0,61		0,79*
Церулоплазмин в	133,11 ±	$116,83 \pm$	$67,40 \pm$	87,35 ±	96,49 ±	$120,67 \pm$
сыворотке крови	12,04	15,13	3,70	10,07	8,96	9,22
СДГ, число гранул	747,3 ±	553,3 ±	621,6 ±	640,7 ±	619,3 ±	619,4 ±
формазана в 50	9,2	5,8 *	10,7	10,8	11,1	6,8
лимфоцитах	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	, ,	·		,	-
Щелочная	51,58 ±	$58,58 \pm$	$135,03 \pm$	$114,80 \pm$	$113,63 \pm$	$90,08 \pm$
фосфатаза, Е/л	6,34	4,61	10,63	13,60	11,08	15,05
					, ,	-
АЛТ, Е/л	59,23±	70,08 ±	67,01 ±	61,69 ±	57,37 ±	54,42 ±
	11,62	10,56	6,51	3,52	4,48	4,88
АСТ, Е/л	$296,88 \pm$	$289,88 \pm$	193,85 ±	$198,86 \pm$	$304,02 \pm$	$279,96 \pm$
	30,72	30,71	17,24	11,46	48,40	16,65
Коэф. Де Ритиса	4,89 ±	$4,52 \pm$	$2,97 \pm 0,17$	3,34 ±	$5,12 \pm 0,39$	5,43 ±
(АСТ/АЛТ)	0,46	0,32		0,22		0,28
Амилаза, Е/л	2463 ± 252	2573±79	3078 ± 393	3637±93	3348 ± 507	3067 ± 28
Билирубин общий,	$1,09 \pm$	1,56 ±	$0,96 \pm 0,14$	1,30 ±	$1,14 \pm 0,10$	1,66 ±
мкмоль/л	0,17	0,14*		0,09*		0,23 *
Креатинин в	$56,43 \pm$	48,14 ±	$46,42 \pm$	52,61 ±	57,95 ±	57,54 ±
сыворотке крови,	5,87	3,26	2,02	2,19 *	3,57	2,99
мкмоль/л					-	
ΓΓΤΠ, Ε/π	$3,7 \pm 1,21$	$2,87 \pm$	$2,66 \pm 0,80$	$2,58 \pm$	$9,89 \pm 1,80$	9,17 ±
		0,81		1,04		1,37
Глюкоза, ммоль/л	9,19 ±	$7,77 \pm$	$7,08 \pm 0,29$	6,94 ±	$7,71 \pm 0,19$	7,38 ±
	1,42	0,43		0,37		0,23
Мочевина, ммоль/л	6,20 ±	5,04 ±	$2,77 \pm 0,15$	$2,79 \pm$	$5,52 \pm 0,93$	4,42 ±
	2,14	2,43		0,34		0,46
Мочевая кислота,	100,50±	103,7±	$102,63 \pm$	$97,50 \pm$	$172,75 \pm$	$146,94 \pm$
мкмоль/л	7,52	6,42	7,66	7,59	24,13	8,33
Общий белок, г/л	69,37±	69,90±	68,71 ±	$70,43 \pm$	72,82 ±	$72,69 \pm$
	2,16	1,65	1,73	1,90	2,37	2,24
Альбумин, г/л	40,78±	39,53±	$40,34 \pm$	$40,50 \pm$	39,63 ±	39,04 ±
	2,22	1,16	1,05	091	1,26	1,52
Глобулины, г/л	28,59±	30,01±	$28,94 \pm$	29,92 ±	33,19 ±	30,11 ±
	1,58	1,04	1,35	1,32	1,41	2,65
Альбумин-	1,56±	1,36±	$1,43 \pm 0,07$	1,38 ±	$1,21 \pm 0,04$	1,17 ±
глобулиновый	0,24	0,07		0,05		0,04
индекс						
ЛДГ, Е/л	2374±	2650±	2125 ± 282	2357±	3512 ± 392	3368±
	238	232		283		237
Суточный объем	31,08 ±	39,00 ±	30,58 ±	$26,83 \pm$	38,42 ±	42,19 ±
мочи, мл	4,72	2,58	2,70	4,54	3,16	3,19
Копропорфирин в	96,6±	83,5 ±	115,2 ±	$106,9 \pm$	$39,8 \pm 11,9$	43,3 ±

Показатели	Время экспозиции					
	3 мес	сяца	6 меся	яцев	10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
моче, нмоль/л	35,3	17,9	59,7	34,6		11,8
Креатинин в моче,	$1,19 \pm$	1,01 ±	$1,73 \pm 0,12$	1,63 ±	$1,27 \pm 0,07$	$1,10 \pm$
ммоль/л	0,12	0,06		0,16		0,09
Общий белок в	$144,1 \pm$	$137,7 \pm$	$69,8 \pm 8,25$	$108,5 \pm$	96,4 ±	$181,8 \pm$
моче, мг/л	12,9	7,4		15,94 *	32,85	122,39
Мочевая кислота в	$52,00 \pm$	79,73 \pm	$181,09 \pm$	$178,36 \pm$	$83,25 \pm 9,9$	$57,50 \pm$
моче, мкмоль/л	11,13	14,01	26,8	29,5		8,1
Мочевина в моче,	$95,2 \pm 7,8$	$106,6 \pm$	$240,3 \pm$	$235,2 \pm$	$175,6 \pm 9,3$	$111,2 \pm$
ммоль/л		14,3	25,2	34,7		8,1 *

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

При ингаляционных экспозициях и кратковременном В пилотном эксперименте, и к 3-месячному сроку основного эксперимента наблюдались признаки стимуляции эритропоэза, а повышенное именно содержание гемоглобина, повышенное число эритроцитов с увеличенной пропорцией ретикулоцитов, повышенный гематокрит. Однако в последующие сроки о возможной реакции костного мозга говорило только статистически значимое повышение пропорции ретикулоцитов.

Найдено в обоих экспериментах статистически значимое увеличение показателя ширины распределения эритроцитов, что может косвенно указывать на укорочение жизненного цикла и ускоренную гибель этих клеток. Напомним, что никель оказывает влияние на эритропоэз и существенно ускоряет старение эритроцитов через изменение свойств мембранных липидов и белков (Sunderman F.W. et al., 1987; Ho V.T. et al., 1996; Tkeshelashvili L. et al., 1989).

Влияние на содержание лейкоцитов в периферической крови (лейкоцитоз) было найдено только в пилотном эксперименте. Во все три срока хронического эксперимента количество лейкоцитов не было изменено, однако наблюдали, сдвиг лейкоцитарной формулы ко второму сроку за счет статистически значимого увеличения доли палочкоядерных нейтрофилов, которое сохранялось в третий срок.

Фазовые изменения показателей красной и белой крови описаны давно при 4-месячном (через день) ингаляционном воздействии микрометровых частиц оксида никеля в концентрации 350 мг/м³ металлического никеля или (Могилевская О.Я., 1963). Было отмечено усиление эритропоэза через 2 недели, которое удерживалось в течение 1,5 месяцев, а затем снижалось до исходного значения или опускалось ниже его. Позднее при проведении непрерывной 3месячной ингаляционной экспозиции к пыли металлического никеля (40 % частиц размером до 5 мкм) в концентрациях 0,5, 0,1 и 0,02 мг/м³ тоже было отмечено увеличение числа эритроцитов в периферической крови после 2,5 месяцев экспозиции с нормализацией этого показателя к концу экспозиционного периода, увеличение количества измененных лейкоцитов в периферической крови на 1 и 2 месяце затравки со снижением до контрольного уровня к концу эксперимента (Рыжсковский В.Л. с соавт., 1974).

Интересно, что подобная фазовость реакции на хроническое ингаляционное воздействие НЧ NiO, возможно свидетельствующая об адаптации организма к нему, обнаружена и по такому важному токсическому эффекту как подавление энергетического метаболизма.

Действительно, типичное снижение цитохимического показателя активности сукцинат дегидрогеназы лимфоцитов крови, которое обычно наблюдается при различных интоксикациях, было выраженным и статистически значимым только к 3-месячному сроку, но вообще отсутствовало в последующем.

Интенсивность перекисного окисления липидов, оцениваемая по концентрации малонового диальдегида (MDA) в сыворотке крови, напротив, была только в последний срок значимо повышена, в то время как в первый – значимо снижена, а в промежуточный срок фактически не изменена. Значимых изменений содержания восстановленного глютатиона и суммарных сульфгидрильных групп в крови не наблюдалось вообще.

Бросается в глаза незначительность и непостоянство многих других (в том числе, органо-специфичных) сдвигов, вызванных низкоуровневой хронической ингаляционной экспозицией к НЧ NiO. Так, если при субхронической

интоксикации, вызванной внутрибрюшинными инъекциями (Глава 4), имели место признаки усиления тормозных процессов в центральной нервной системе суммации подпороговых (удлинение показателя импульсов, снижение поведенческих показателей исследовательской И общей двигательной активности), подробно описанными в Главе 4, то в хроническом ингаляционном эксперименте ни по одному из названных показателей не было статистически значимого отличия от контрольной величины, а их общий тренд имел скорее противоположную направленность – особенно в конце экспозиционного периода. Это обстоятельство интересно в особенности потому, что при ингаляционной экспозиции одной из мишеней действия наночастиц, первично отлагающихся в носовых ходах, является головной мозг, в который они, как сказано в предыдущем разделе этой Главы перемещаются по волокнам ольфакторного нерва (Kao Y.Y. et al., 2012; Elder A. et al., 2006, Enea M. et al., 2019).

И действительно, при электронной микроскопии препаратов обонятельных луковиц головного мозга крыс данного эксперимента (Рисунок 5.2.3) видны и скопления наночастиц и ультраструктурные повреждения (Рисунки 5.2.4 и 5.2.5). При этом усредненное содержание никеля в гомогенизированной ткани всего мозга было лишь еле заметно увеличено, что косвенно подтверждает локальность церебральной задержки НЧ NiO, ограниченной ольфакторным трактом.



Рисунок 5.2.3 – Наночастицы в теле нейрона обонятельной луковицы головного мозга крысы после 3 месяцев ингаляции наночастиц NiO в концентрации 0,23 мг/м³. ПЭМ, увеличение x13790



Рисунок 5.2.4 – Аутолиз в теле нейрона обонятельной луковицы головного мозга крысы после 3 месяцев ингаляции наночастиц NiO в концентрации 0,23 мг/м³. ПЭМ, увеличение х7620



Рисунок 5.2.5 – Участки демиелинизации волокон обонятельной луковицы головного мозга крысы после 3 месяцев ингаляции наночастиц NiO в концентрации 0,23 мг/м³. ПЭМ, увеличение x11770

Отсутствует значимое изменение относительной массы печени, селезенки, а также ряда показателей функции печени во все три срока хронического эксперимента (содержание белка и отдельных белковых фракций в сыворотке крови и активность аминотрансфераз, щелочной фосфатазы). Статистически значимое же увеличение содержания билирубина в сыворотке крови во все три срока может быть показателем усиленного разрушения эритроцитов в большей мере, чем показателем, отражающим нарушение функции печени. Однако токсическое действие НЧ NiO на печень отрицать нельзя. При кратковременном воздействии (Таблица 5.2.1) было найдено увеличение массового показателя печени, содержания мочевины в сыворотке крови, уровня ЛДГ.

Протеинурия, статистически значимая только к 6-месячному сроку может отражать нарушение функции почек, хотя изменений других показателей, отражающих нефротоксическое действие, отмечено не было (диурез, плотность мочи, эндогенный клиренс креатинина). Малая выраженность гепато- и нефротоксического эффектов может быть объяснена тем, что содержание никеля в названных органах как суммарное (по данным АЭС), так и в форме NiO (по данным ЭПР-спектроскопии) практически не отличалось от контрольных показателей. Так, в печени к концу 10-месячного периода оно равнялось в контрольной группе, соответственно, $0,65\pm0,22$ и $0,06\pm0,02$ мкг на грамм сухой ткани, а в экспонированной группе – $0,73\pm0,17$ и $0,07\pm0,03$ мкг/г; в почках же $0,31\pm0,08$ и $0,03\pm0,01$ мкг/г в контрольной, а в экспонированной $0,35\pm0,06$ и $0,02\pm0,01$ мкг/г. Точно так же не было отмечено дополнительного накопления никеля и в селезенке экспонированных крыс: $0,25\pm0,07$ мкг/г по данным АЭС и $0,01\pm0,01$ мкг/г по данным ЭПР (против $0,27\pm0,03$ и $0,02\pm0,00$ мкг/г у контрольных).

Между тем, оба показателя содержания никеля в крови экспонированных крыс (0,48±0,05 и 0,53±0,14 и мкг/г) были выше соответствующих контрольных величин (0,39±0,07 и 0,30±0,07 мкг/г), но ненамного и статистически не значимо.

Такое низкое содержание НЧ NiO в органах вновь может объяснить его достаточно высокая растворимость в биологических средах – в БАЛЖе и еще более высокой в бычьей сыворотке (Рисунок 5.2.6)



Рисунок 5.2.6 – Кинетика снижения интенсивности (в произвольных единицах) ЭПР-сигнала от НЧ NiO, собранных на выходном PSI – фильтре, при его инкубации (а) в воде или физ. растворе; (б) в супернатанте БАЛЖ; (в) в стерильной бычьей сыворотке крови.

Особого упоминания в случае ингаляционного воздействия требует увеличение как сырой, так и сухой массы легких, типичное для любого экспериментального пневмокониоза, но в данном случае статистически значимое только к 10-месячному сроку. К этому сроку была наиболее высокой и задержка никеля в легочной ткани по данным как АЭС ($3,69\pm0,35$ против $0,96\pm0,30$ мкг/кг в контрольной группе; P<0,05), так и ЭПР-спектроскопии (соответственно, $0,39\pm0,04$ и $0,09\pm0,03$ мкг/кг; P<0,05). При электронной микроскопии легких также обнаружено увеличение количества НЧ к последнему сроку, хотя немалое число наночастиц или их нано-размерных агрегатов во все сроки исследования НЧ видны не только как интернализированные фагоцитирующими клетками, но и

свободно лежащими внутри альвеол, что, по-видимому, является результатом их недавнего отложения из вдыхаемого воздуха, (Рисунок 5.2.7).



Рисунок 5.2.7 – Легкие крысы после 3 месяцев ингаляции NIO-NP в концентрации 0,23 мг/м³. Агрегаты наночастиц в просвете альвеолы, наночастицы в цитоплазме сегментоядерного лейкоцита. ПЭМ, увеличение x6500.





Рисунок 5.2.8 – Легкие крыс (а) после 10-месячной ингаляционной НЧ NiO экспозиции; (б) в контрольной группе того же срока. Импрегнация серебром по Гомори, увеличение х400. Описание в тексте.

В то же время, при оптико-микроскопическом гистологическом исследовании легочной ткани даже к концу эксперимента не обнаружены ни типичные для эксперименртальных пневмокониозов клеточно-фиброзные узелки, ни утолщение или диффузный фиброз межальвеолярных перегородок, которые скорее истончены или даже разрушены (эмфизема), а ретикулиновая строма не грубее, чем у контрольных крыс (Рисунок 5.2.8).

ультраструктурные изменения найдены Некоторые легких И при электронной микроскопии. Так, с самого раннего срока в легочной ткани часть клеток подвергается вакуолизации (Рисунок 5.2.8). Альвеолоциты II типа найдены функциональных состояниях: опустошенными В двух клетки С мультиламелярными тельцами (Рисунок 5.2.9) и клетки которых В вся гиалоплазма забита мультиламелярными тельцами со слипшимся сурфактантом (Рисунок 5.2.10), чего не наблюдается в легких контрольных крыс (Рисунок 5.2.11). В эндотелиальных клетках капилляров у крыс, подвергавшихся

экспозиции к NiO отмечается увеличение количества пиноцитозных пузырьков (Рисунок 5.2.12).



Рисунок 5.2.8 – Легкие крысы после 3 месяцев ингаляции НЧ NiO в концентрации 0,23 мг/м³. Очаги некроза. ПЭМ, увеличение x6740.



Рисунок 5.2.9 – Легкие крысы после 3 месяцев ингаляции НЧ NiO в концентрации 0,23 мг/м³. Альвеоциты 2 типа с опустошенными мультиламеллярными тельцами. ПЭМ, увеличение x13960.



Рисунок 5.2.10 – Легкие крысы после 3 месяцев ингаляции НЧ NiO в концентрации 0,23 мг/м³. Альвеоциты 2 типа. Мультиламеллярные тельцами со слипшимся сурфактантом. ПЭМ, увеличение x15330.



Рисунок 5.2.11 – Легкие контрольных крыс. Альвеоциты 2 типа мультиламеллярными тельца с сурфактантом. ПЭМ, увеличение x19080.



Рисунок 5.2.12 – Легкие крысы после ингаляции НЧ NiO в концентрации 0,23 мг/м³. Пиноцитозные пузырьки в эндотелиальных клетках капиллярах. ПЭМ, увеличение x54520.

Помимо рассмотренных выше функциональных показателей, во внутренних органах имелись заметные, хотя и умеренные патологические изменения гистологической структуры, подтвержденные морфометрической оценкой (Таблицы 5.2.4 и 5.2.5). Получены значимые сдвиги всех трех показателей в печени кроме увеличения числа безъядерных гепатоцитов в первый срок. То, что этот эффект был фактически незаметен после 3-месячной экспозиции, вполне соответствует тому, что в этот срок задержка никеля в печени была еще ничтожно низкой (по данным АЭС 0,10±0,05 против 0,08±0,03 мг/кг в контроле; по данным ЭПР – соответственно, 0,02±0,02 мг/кг и 0,00). Таким образом, и по гепатотоксическому эффекту не видно признаков адаптации организма к действию НЧ NiO.

Таблица 5.2.4 — Морфометрические показатели печени и селезенки крыс, подвергавшихся ингаляционной затравке наночастицами NiO в концентрации 0,23 $M\Gamma/M^3$, $(X \pm S_x)$

Показатели			Время эксг	юзиции		
	3 меся	ща	6 меся	цев	10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
		Пе	ечень,			
	коли	ичество на	100 клеток печ	нени		
Безъядерные	15,7±0,7	17,0±0,7	18,1±0,4	41,8±1,1*	24,0±0.8	48,5±1,
гепатоциты						1*
Двухядерные	3,3±0,3	4,9±0,4*	3,9±0,2	3,1±0,3*	2,2±0,2	3,7±0,3
гепатоциты						*
Клетки Купфера	15,2±0,4	16,8±0,4	16,5±0,3	18,7±0,4*	16,8±0.5	19,5±0,
		*				4*
		Сел	іезенка			
Отношение	3,8±0,6	3,3±0,5	2,0±0,2	2,2±0,3	2,1±0,3	1,9±0,3
красной к белой						4
пульпы						
Диаметр фоликула,	12,9±0,4	14,0±0,3	13,2±0,4	15,0±0,5*	13,0±0,4	14,6±0,
МКМ						5*

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0.05$ по tкритерию Стьюдента).

Сниженное планиметрическое отношение красной пульпы селезенки к белой, обычно наблюдаемое в субхронических внутрибрюшинных экспериментах с наночастицами, в данном ингаляционном эксперименте обнаружено только к первому и последнему срокам исследования, причем не было статистически значимым. Однако о реакции белой пульпы говорит наблюдавшееся во все сроки увеличение среднего диаметра лимфоидных фолликулов. Можно предположить, что речь идет о реактивной фолликулярной гиперплазии, связанной не столько с задержкой наночастиц в этом органе, сколько с рассмотренным ниже (при обсуждении данных Таблицы 5.2.7) вероятностью аллергического синдрома.

Показатели	Время экспозиции					
	3 месяца		6 мес	сяцев	10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	Контроль	Контроль	HЧ NiO
Потеря	6,7±1,8	15,7±4,0*	7,9±3,5	17,2±5,1	4,5±2,5	6,2±2,6
щеточной						
каемки, %						
Десквамация	1,3±1,1	2,1±1,2	1,1±0,6	$1,6\pm0,8$	1,9±0,8	14,1±4,3*
эпителия, %						

Таблица 5.2.5 – Морфометрические показатели почек крыс, подвергавшихся ингаляционной затравке наночастицами NiO в концентрации 0,23 мг/м³, $(X \pm S_x)$

Примечание:

* – статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Для почек, как обычно, наиболее характерно повреждение тубулярного эпителия (Рисунок 5.2.13 и Таблица 5.2.5), наиболее четкими признаками, которого служат потеря щеточной каемки в проксимальных извитых канальцах и полная десквамация клеток. Первый из этих эффектов, наблюдался во все сроки эксперимента, однако статистически значимым был только в 3-месячный, а второй – только в 10-месячный.





Рисунок 5.2.13 – (а) Почки контрольных крыс (проксимальные извитые канальцы и неповрежденная щеточная каемка). (б) Почки крыс после 10-месячной ингаляционной НЧ NiO экспозиции (дегенеративные и некробиотические изменения тубулярного эпителия - полная десквамация эпителия частичная потеря щеточной каемки. Окраска ШИК, увеличение х400.

Изучение мазков отпечатков легких, трахеобронхиальных лимфоузлов, печени, почек и селезенки выявило патологические изменения во всех исследуемых органах.

Таблица 5.2.6 – Некоторые цитологические характеристики различных тканевых мазков-отпечатков крыс через 24 часа после ингаляционного воздействия наночастиц NiO в концентрации 0,23 мг/м³, в процентах от общего количества клеток, $(X \pm S_x)$

Органы и клетки	Длительность экспозиции							
	3 мес	сяца	6 месяцев		10 месяцев			
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO		
	Легкие							
Нейтрофилы	20,00 ±	$14,40 \pm$	7,86 ±	3,14 ±	4,40 ±	$2,40 \pm 0,24$		
	0,55	2,46 *	0,50	0,46 *	0,51	*		
Дегенеративно								
измененные								
нейтрофилы	$2,00 \pm$	$4,60 \pm$	$2,86 \pm$	$3,00 \pm$	$2,40 \pm$			
	0,32	0,43 *	0,76	0,69	0,51	$2,00 \pm 0,45$		

Органы и клетки	Длительность экспозиции					
	2	2				
	3 Mec	зца	6 Mec	яцев	10 MG	есяцев
	Контроль	HY N1O	Контроль	НЧ №О	Контроль	HY N1O
Альвеолярные	4,60 ±	$4,00 \pm$	5,43 ±	$10,29 \pm$	4,60 ±	$15,40 \pm$
макрофаги	0,51	0,38	0,57	1,91 *	0,51	0,75 *
Дегенеративно-						
измененные						
альвеолярные	$2,80 \pm$	$26,60 \pm$	$2,29 \pm$	$28,43 \pm$	$3,40 \pm$	$34,00 \pm$
макрофаги	1,32	3,79 *	0,46	1,84 *	0,81	1,38 *
Клетки эпителия	$9,40 \pm$	$6,60 \pm$	9,71 ±	$7,57 \pm$	$12,40 \pm$	$7,40 \pm 1,08$
бронхов	2,18	1,02	0,63	0,65 *	0,51	*
Дегенеративно-						
измененные клетки	$3,50 \pm$	$5,80 \pm$	4,14 ±	$17,14 \pm$	$4,00 \pm$	$18,80 \pm$
эпителия бронхов	0,68	1,05	0,52	1,22 *	0,55	1,93 *
	53,25 ±	$33,80 \pm$	65,71 ±	$30,86 \pm$	$68,00 \pm$	$19,60 \pm$
Лимфоциты	2,29	3,68 *	2,30	2,22 *	1,67	1,47 *
	$4,00 \pm$	$4,20 \pm$	$2,00 \pm$	$4,00 \pm$	$0,80 \pm$	
Эозинофилы	0,66	0,86	0,20	0,44 *	0,20	$0,\!40 \pm 0,\!24$
		Пе	чень			
Клетки эпителия						
протоков (кубический	$15,50 \pm$	$12,29 \pm$	8,71 ±	9,43 ±	8,50 ±	
эпителий)	1,29	0,87	0,71	0,65	0,85	$7,\!67 \pm 0,\!67$
	$55,50 \pm$	37,71 ±	$80,86 \pm$	$58,00 \pm$	$71,33 \pm$	62,00 ±
Гепатоциты	1,57	1,48 *	1,35	1,41 *	1,73	1,59 *
Дегенеративно-						
измененные	$8,75 \pm$	21,86 ±	3,29 ±	$11,43 \pm$	5,33 ±	$8,17 \pm 0,48$
гепатоциты	0,84	0,99 *	0,42	0,87 *	0,42	*
	$7,20 \pm$	$11,57 \pm$	3,71 ±	8,14 ±	5,83 ±	$11,17 \pm$
Нейтрофилы	0,66	0,97 *	0,68	0,51 *	0,40	0,95 *
	3,50 ±	7,29 ±	0,71 ±	4,29 ±	3,50 ±	
Эозинофилы	0,40	0,68 *	0,18	0,61 *	0,67	$3,00 \pm 0,37$
	$2,75 \pm$	1,86 ±	$0,86 \pm$	1,29 ±	$1,00 \pm$	
Двуядерные клетки	0,40	0,34	0,14	0,18	0,00	$1,00 \pm 0,00$
	3,00 ±	5,43 ±	$1,29 \pm$	4,14 ±	3,17 ±	
Купферовские клетки	0,68	0,48 *	0,18	0,91 *	0,60	$4,\!67\pm0,\!49$
	$2,60 \pm$	2,86 ±	$0,57 \pm$	2,86 ±	$1,33 \pm$	
Фибробласты	0,93	0,51 *	0,20	0,51 *	0,33	$2,33 \pm 0,42$
		По	ОЧКИ			
Клетки						
проксимальных	$67,75 \pm$	$51,00 \pm$	$67,86 \pm$	$61,14 \pm$	$71,50 \pm$	57,71 ±
канальцев	0,85	1,60 *	2,01	1,44 *	0,85	1,38 *
Дегенеративные	$11,33 \pm$	22,71 ±	5,29 ±	$12,00 \pm$	5,50 ±	$13,00 \pm$
клетки	0,58	1,64 *	0,29	0,82 *	0,45	0,76 *

Органы и клетки	Длительность экспозиции					
	3 мес	сяца	6 мес	яцев	10 м	есяцев
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
проксимальных						
канальцев						
Клетки дистальных	7,67 ±	$10,00 \pm$	$10,00 \pm$	5,29 ±	8,83 ±	$6,43 \pm 0,48$
канальцев	0,85	0,72	0,93	0,61 *	0,76	*
Дегенеративные						
клетки дистальных	5,67 ±	8,43 ±	4,71 ±	9,43 ±	4,33 ±	$9,43 \pm 0,53$
канальцев	0,65	0,65 *	0,42	0,65 *	0,22	*
	3,00 ±	2,43 ±	5,86 ±	5,57 ±	5,50 ±	
Нейтрофилы	0,41	0,37	0,80	0,84	0,34	$6,14 \pm 0,51$
	3,50 ±	4,86 ±	3,71 ±	3,71 ±	3,00 ±	$5,57 \pm 0,37$
Моноциты	0,29	0,40 *	0,29	0,57	0,34	*
	$0,50 \pm$	$0,29 \pm$	2,00 ±	$1,29 \pm$	1,33 ±	
Эозинофилы	0,29	0,18	0,38	0,18	0,22	$1,00 \pm 0,22$
Фибробласты	0,50 ±	0,29 ±	$0,57 \pm$	$1,57 \pm$	$0,00 \pm$	$0,71 \pm 0,29$
	0,29	0,18	0,20	0,37 *	0,00	*
		Лимо	роузлы			
Зрелые лимфоциты,	91,80 ±	$78,29 \pm$	93,29 ±	84,14 ±	91,33 ±	$78,86 \pm$
пролимфоциты	1,02	3,48 *	0,68	1,06 *	1,13	1,93 *
	$1,20 \pm$	3,29 ±	1,14 ±	1,43 ±	$1,00 \pm$	
Лимфо-бласты	0,37	0,36 *	0,14	0,20	0,00	$1,14 \pm 0,14$
	$0,80 \pm$	$0,57 \pm$	$0,43 \pm$	$0,43 \pm$	$0,00 \pm$	
Ретикулярные клетки	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00	$0,00 \pm 0,00$
	$2,80 \pm$	$7,57 \pm$	2,29 ±	$9,57 \pm$	3,33 ±	$9,14 \pm 1,70$
Плазмоциты	0,37	2,17	0,52	0,57 *	1,13	*
	1,20 ±	3,86 ±	1,14 ±	1,86 ±	2,00 ±	
Макрофаги	0,20	0,63 *	0,14	0,26 *	0,41	$2,71 \pm 0,57$
	$1,40 \pm$	0,71 ±	$1,00 \pm$	1,43 ±	1,17 ±	$5,43 \pm 0,69$
Нейтрофилы	0,24	0,29	0,22	0,37	0,18	*
	$0,60 \pm$	5,71 ±	0,71 ±	1,14 ±	$1,17 \pm$	$2,71 \pm 0,42$
Эозинофилы	0,40	1,43 *	0,18	0,14	0,18	*
		Селе	езенка			
Зрелые лимфоциты,	$85,60 \pm$	$72,57 \pm$	$90,00 \pm$	82,43 ±	$90,50 \pm$	82,43 ±
пролимфоциты	2,29	1,73 *	0,69	1,49 *	0,29	1,49 *
	$0,80 \pm$	$1,29 \pm$	1,29 ±	$0,86 \pm$	$1,17 \pm$	
Лимфобласты	0,20	0,29	0,18	0,14	0,18	$0,86 \pm 0,14$
-	$0,80 \pm$	$0,57 \pm$	$0,57 \pm$	$0,57 \pm$	$0,67 \pm$	
Ретикулярные клетки	0,37	0,20	0,20	0,20	0,22	$0,57 \pm 0,20$
Плазмоциты						
	$1,40 \pm$	$3,00 \pm$	2,57 ±	$3,57 \pm$	2,33 ±	
	0.24	0.53 *	0.72	0.95	0.85	3.57 ± 0.95

Органы и клетки	Длительность экспозиции							
	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев			
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO		
	2,40 ±	3,14 ±	1,43 ±	2,14 ±	$1,17 \pm$			
Макрофаги	0,24	0,34	0,30	0,40	0,18	$2,14 \pm 0,40$		
	$2,40 \pm$	4,43 ±	$2,57 \pm$	5,71 ±	$2,67 \pm$	$5,71 \pm 0,47$		
Нейтрофилы	0,51	0,37 *	0,48	0,47 *	0,50	*		
	$4,60 \pm$	$13,71 \pm$	$2,57 \pm$	4,71 ±	$2,67 \pm$	$4,71 \pm 0,52$		
Эозинофилы	0,68	0,97 *	0,43	0,52 *	0,53	*		

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль» (при p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).

Как видно из Таблицы 5.2.6 в тканевых отпечатках легких, наблюдается 10кратное увеличение доли дегенеративно измененных макрофагов во все три срока исследования.

Сдвиги доли эозинофилов, наблюдаются только во второй срок. Увеличение доли дегенеративно измененных клеток эпителия приобретает значимость ко второму и третьему срокам.

В отпечатках трахеобронхиальных лимфоузлов обращает на себя внимание, прежде всего, значимое снижение доли лимфоцитов за счет увеличения доли других клеточных элементов, но в основном – клеток воспаления.

В печени под влиянием НЧ NiO происходит статистически значимое увеличение в первые два срока доли фибробластов, достоверное увеличение доли дегенеративно-измененных гепатоцитов с одновременным значимым снижением доли не измененных гепатоцитов во все три срока исследования. Наблюдается увеличение доли клеток Купфера – в первых двух сроках статистически значимо. Возможно, этот сдвиг связан с активацией данной популяции резидентных макрофагов под влиянием фагоцитируемых ими наночастиц или является косвенным признаком усиленного апоптоза гепатоцитов (учитывая роль клеток Купфера в утилизации апоптозных телец (Canbay A. et al., 2003).

В отпечатках почек отмечено повреждение клеток как проксимальных, так и дистальных извитых канальцев, характеризуемое в значимом снижении доли не

измененных и увеличении доли дегенеративно измененных клеток в соответствующих отделах нефрона. Найдено увеличение доли фибробластов ко второму и третьему сроку.

Интересно, что по некоторым важным показателям этого рода (например, по проценту эозинофилов в отпечатках печени и селезенки) мы вновь видим ослабление вызванных экспозицией сдвигов по мере удлинения экспозиционного периода.

При анализе тканевых отпечатков этих же органов после 5-кратного ингаляционного воздействия НЧ NiO в концентрации 1 мг/м³ наблюдаются сдвиги той же направленности, что свидетельствует о развитии выраженной воспалительной реакции гиперергического типа.

Таблица 5.2.7 – Некоторые цитологические характеристики различных тканевых мазков-отпечатков крыс через сутки после 5-кратного ингаляционного воздействия наночастиц NiO в концентрации 1 мг/м³, в процентах от общего количества клеток, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Орган	Показатели	Контроль	HЧ NiO
Легкие	Нейтрофилы	8,00 ± 0,81	$10,\!29 \pm 0,\!87$
	Альвеолярные макрофаги	$6,25 \pm 0,89$	6,86 ± 1,30 *
	Дегенеративно-измененные		
	альвеолярные макрофаги	$6,25 \pm 0,81$	28,71 ± 3,34 *
	Клетки эпителия бронхов	$19,00 \pm 1,66$	11,71 ± 1,04 *
	Дегенеративно-измененные клетки		
	эпителия бронхов	$7,50 \pm 1,36$	$8,14 \pm 1,64$
	Лимфоциты	$49,25 \pm 2,52$	21,14 ± 2,18 *
	Эозинофилы	$1,75 \pm 0,49$	10,00 ± 1,31 *
Печень	Клетки эпителия протоков		
	(кубический эпителий)	$15,50 \pm 1,29$	$12,29 \pm 0,87$
	Гепатоциты	$55,50 \pm 1,57$	37,71 ± 1,48 *
	Дегенеративно-измененные		
	гепатоциты	$8,75 \pm 0,84$	21,86 ± 0,99 *
	Нейтрофилы	$7,25 \pm 0,66$	11,57 ± 0,97 *
	Эозинофилы	$3,50 \pm 0,40$	7,29 ± 0,68 *
	Двуядерные клетки	$2,75 \pm 0,40$	$1,86 \pm 0,34$
	Купферовские макрофаги	$3,00 \pm 0,68$	5,43 ± 0,48 *
	Фибробласты	$3,00 \pm 0,93$	2,86 ± 0,51 *
Почки	Клетки проксимальных канальцев	$67,75 \pm 0,85$	51,00 ± 1,60 *
	Дегенеративные клетки		
	проксимальных канальцев	$11,33 \pm 0,58$	22,71 ± 1,64 *

Орган	Показатели	Контроль	НЧ NiO
	Клетки дистальных канальцев	$7,\!67 \pm 0,\!85$	$10,00 \pm 0,72$
	Дегенеративные клетки дистальных		
	канальцев	$5,\!67 \pm 0,\!65$	8,43 ± 0,65 *
	Нейтрофилы	$3,00 \pm 0,41$	$2,43 \pm 0,37$
	Моноциты	$3,33 \pm 0,29$	4,86 ± 0,40 *
	Эозинофилы	$0,33 \pm 0,29$	$0,29 \pm 0,18$
	Фибробласты		
		$0,67 \pm 0,29$	$0,29 \pm 0,18$
Лимфоузлы	Зрелые лимфоциты. пролимфоциты	$91,80 \pm 1,02$	78,29 ± 3,48 *
	Лимфобласты	$1,20 \pm 0,37$	3,29 ± 0,36 *
	Ретикулярные клетки	$0,80 \pm 0,20$	$0,57 \pm 0,20$
	Плазмоциты	$2,80 \pm 0,37$	$7,57 \pm 2,17$
	Макрофаги	$1,20 \pm 0,20$	3,86 ± 0,63 *
	Нейтрофилы	$1,40 \pm 0,24$	$0,71 \pm 0,29$
	Эозинофилы	$0,60 \pm 0,40$	5,71 ± 1,43 *
Селезенка	Зрелые лимфоциты. пролимфоциты	$85,60 \pm 2,29$	72,57 ± 1,73 *
	Лимфобласты	$0,80 \pm 0,20$	$1,29 \pm 0,29$
	Ретикулярные клетки	$0,80 \pm 0,37$	$0,57 \pm 0,20$
	Плазмоциты	$1,40 \pm 0,24$	3,00 ± 0,53 *
	Макрофаги	$2,40 \pm 0,24$	$3,14 \pm 0,34$
	Нейтрофилы	$2,40 \pm 0,51$	4,43 ± 0,37 *
	Эозинофилы	$4,60 \pm 0,68$	13,71 ± 0,97 *

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Содержание специфического IgE в сыворотке крови не отличалось статистически значимо от контроля, хотя наблюдалось активация реакции специфического лизиса лейкоцитов в последний срок хронического эксперимента после ингаляции HЧ NiO (15,84±2,28) по сравнению с контролем (7,56±0,74), различие статистически значимо при (p<0,05) по t-критерию Стьюдента.

То, что никель является аллергеном и может вызывать эозинофилию хорошо известно. Появляются исследования аллергенного свойства и наночастиц Ni. Tak, Lee S. et al. (2016) для изучения характера эозинофильной реакции вводили интратрахеально крысам самкам линии Вистар в различных концентрациях НЧ NiO (50, 100 и 200 мл/крыса), воспаление легких оценивали в различные сроки (1, 2, 3 и 4 сут). Проводили сравнение с группой, которой вводили NiCl₂ 171,1 мкг/крыса, что эквивалентно концентрации 200 мл/крыса НЧ

NiO и в качестве положительного контроля применяли модель аллергического воспаления дыхательных путей, вызванного овальбумином. Цитологический анализ и биохимический анализ БАЛЖ и сыворотки крови показал, что интратрахеальная инстялляция НЧ NiO вызывала нейтрофилию через 1 и 2 дня смешанный тип нейтрофильного после введения, В то время как И эозинофильного воспаления наблюдался через 3 и 4 дня, что соответствовало реакции от воздействия NiCl₂ через сутки. Приток эозинофилов при воздействии НЧ NiO не был связан ни с уровнями общего IgE, ни с анафилотоксинами. Лизис альвеолярных макрофагов и нормальной легочной ткани показал высокий уровень внутриклеточного эотаксина, а уровень ЛДГ-положительную корреляцию с уровнем эотаксина.

Таким образом, несмотря на довольно короткий период ингаляции и, казалось бы, низкий уровень экспозиции, мы видим некоторые типичные неблагоприятные эффекты на органы-мишени, а также токсическое воспаление гиперергического типа, о чем свидетельствует выраженный эозинофильный ответ, подобную реакцию мы наблюдали в ранее проведенных внутрибрющинных экспериментах (Minigalieva I.A. et al., 2018). Следует отметить острую и общепризнанную, но все еще неудовлетворительно решенную проблему «наночастиц и алергии» (Radauer-Preiml I. et al., 2016). Возможно, что НЧ металлов и их оксидов оказывают особую способность токсическое воспаление гиперергического типа, однако для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные специально поставленные эксперименты.

Важнейшим из обнаруженных эффектов токсического воздействия НЧ NiO следует считать статистически значимое BO все 3 срока ингаляционной экспозиции увеличение (по сравнению с контрольными показателями) (Кфр) ДНК коэффициента фрагментации геномной В циркулирующих ядросодержащих клетках крови (Таблица 5.2.8).

ингаляционно	галяционной затравке наночастицами Fe_2O_3 в концентрации 1,14 мг/м ² , (X \pm S _x)							
Время ингаляционной экспозиции								
3	мес	6 м	лес	10 мес				
Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO			
0,4229 <u>+</u>	0,4480 <u>+</u>	0,4247 <u>+</u>	0,5332 <u>+</u>	0,4244 <u>+</u>	0,5447 <u>+</u>			
0,0008	0,0017*	0,0006	0,0031*•	0,0005	0,0036*°			

Таблица 5.2.8 – Коэффициент фрагментации геномной ДНК в ядросодержащих клетках периферической крови крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной затравке наночастицами Fe₂O₃ в концентрации 1,14 мг/м³, (X ± S_x)

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – между группами «НЧ NiO 3 мес» и «НЧ NiO 6 мес»; • – между группами «НЧ NiO 6 мес» и «НЧ NiO 10 мес» (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

Особо отметим, что если в контрольной группе данного эксперимента значение Кфр оставалось фактически постоянным на протяжении всего периода наблюдения, то в экспонированной происходит его статистически значимое увеличение с нарастанием длительности ингаляционной экспозиции (при статистически значимом различии между сроками).

Таким образом, по генотоксическому эффекту никакой тенденции к адаптации организма к действию НЧ NiO не видно, а, напротив, имеет место нарастание этого эффекта.

5.3. Некоторые общие соображения о задачах и условиях проведения хронических ингаляционных экспериментов с наноразмерными аэрозолями

Экспериментальное изучение токсичности и опасности веществ в наносостоянии, актуально в рамках проблемы научного обоснования оценок обусловленного ими риска и управления им. Важнейшая информация о действии НЧ на организм может и должна быть в первую очередь получена с помощью более простых и доступных экспериментальных моделей этого действия (таких как разовое и повторное внутрижелудочное и интратрахеальное введение мышам или крысам водных суспензий НЧ с заданными геометрическими и физикохимическими характеристиками). Однако уточнение этой информации и основанных на ней решений делает на следующем этапе высоко целесообразным проведение хронических ингаляционных нанотоксикологических экспериментов. Это прежде всего относится к НЧ элементных веществ (металлов или металлоидов) и особенно их оксидов, поскольку именно такие НЧ чаще всего образуют промышленные аэрозоли.

К наиболее актуальным задачам, для решения которых хронические ингаляционные эксперименты действительно должны считаться методом выбора, следует отнести: (а) характеристику кинетики накопления НЧ в легких и в других органах и выведения из организма при умеренной или низко-уровневой ингаляционной экспозиции, наиболее близкой к реальным условиям воздействия НЧ-аэрозолей на человека; (б) оценку эффективности защитных и интенсивности патологических механизмов реакции организма на такие воздействия; (в) уточненное обоснования безопасных для здоровья уровней воздействия НЧаэрозолей на человека (ПДК).

Геометрические и физико-химические характеристики воздействующих НЧ, и основные параметры воздействия не могут быть стандартными, а выбираются исходя из конкретных задач каждого исследования, но с учетом некоторых общих принципов, рассматриваемых ниже.

Под мелкими лабораторными животными подразумеваются мыши, крысы, морские свинки и хомячки, однако (как и в профилактической ингаляционной токсикологии в целом) в рассматриваемых здесь исследованиях используются преимущественно крысы и реже – мыши.

Основные типы и ключевые параметры ингаляционной экспозиции и принципы мониторинга этих параметров

Решение поставленных выше задач требует наиболее точно оцениваемого и практически одинакового уровня воздействия НЧ на всех животных подопытной группы и исключения возможности не поддающегося количественному учету неингаляционного пути поступления изучаемых НЧ в организм (в частности, в результате слизывания с загрязняемой ими шерстки). Как и в экспериментах с

полидисперсной пылью, все ЭТО наиболее надежно обеспечивается В ингаляционных систем типа «только нос», которым, как правило, и должно отдаваться предпочтение. Вместе с тем, существенным недостатком таких систем является иммобилизационный стресс и возможность развития связанных с ним побочных эффектов или усиления реальных эффектов действия ингалируемых НЧ. В связи с этим требуется (a) обязательная одновременная «ложная экспозиция» (a sham exposure), то есть посадка животных контрольной группы в «пеналы – ограничители подвижности» (restrainers) идентичной ингаляционной установки, питаемой равным по объему потоком чистого воздуха, и (б) ограничение времени разовой экспозиции (судя по имеющемуся опыту – не более 4 часов).

Только при решении некоторых специальных задач эксперимента, требующих более длительной или даже непрерывной экспозиции (например, для обоснования безопасного содержания НЧ в атмосферном воздухе населенных мест), должны использоваться ингаляционные системы (камеры) типа «все тело», но при обязательном индивидуальном размещении животных внутри таких камер по решетчатым ячейкам, не иммобилизующим их, но исключающим возможность скучивания.

Конструкция установки типа только нос (наиболее часто, но не обязательно - цилиндрическая «башня» с многоярусным расположением по ее окружности тех патрубков, к которым подключаются «пеналы» с животными), а также ее аэродинамические характеристики и объемы воздуха, подаваемого в общее рабочее пространство и удаляемого из него, должны обеспечить:

(а) быстрое достижение равновесного уровня заданной концентрации НЧ;

(б) совпадение ее (по усредненным величинам) во всех точках подсоединения животных как по вертикали, так и по окружности;

(в) небольшое отрицательное давление в рабочем пространстве, препятствующее выбиванию НЧ из него в лабораторное помещение.

Последнее условие, продиктованное требованиями безопасности труда персонала, не исключает необходимости расположения установки в целом внутри

вытяжного шкафа, но и не отменяется при наличии последнего. Режим эксплуатации установки, обеспечивающий соответствие всем названным требованиям отрабатывается перед началом каждого конкретного эксперимента.

Аналогичные требования (с поправкой на конструктивные различия между ингаляционными установками разных типов) предъявляются и к системам «все тело».

В процессе проведения эксперимента на животных в предварительно выбранных репрезентативных точках рабочего пространства установки должны непрерывно отбираться аспирационные пробы НЧ на фильтры, тип которых, как и методы измерения массы и геометрических характеристик задержанных НЧ (формы, распределения по размерам) выбираются с учетом химической природы и физических свойств этих НЧ. Концентрации НЧ в воздухе обычно выражаются как массо-объемные (как правило, в мг/м³), но дополнительный интерес может представлять и число НЧ в единице объема воздуха (обычно в мл). Желательно наличие в системе также того или иного автоматического измерителя счетной концентрации НЧ, показания которого позволяют оперативно оценивать стабильность работы установки.

Наряду с концентрацией НЧ, должен быть обеспечен также автоматический контроль температуры и влажности воздуха в пределах, являющихся физиологическими для данного вида животных.

Основные способы генерации НЧ-аэрозолей для подачи в ингаляционную установку

В тех случаях, когда целью исследования является решение задач применительно к конкретному веществу, специально производимому в форме НЧ с заданными характеристиками (так называемых engineered nanoparticles), исходным аэрозоль-образующим материалом должен служить порошок именно этого материала (представляемый на стадии его разработки или уже коммерчески доступного). Этим материалом загружается пыле-генератор той или иной конструкции, действующий по принципу механического взмучивания частиц порошка в потоке воздуха.

Такой же генератор используется для ресуспедирования в потоке воздуха НЧ из реальных образцов пыли, отобранных в конкретном металлургическом или ином производстве. Повторность загрузки генератора, интенсивность механического воздействия, скорость воздушного потока, необходимость и способ последующего освобождения полученного НЧ-аэрозоля от крупных частиц и его разбавления чистым воздухом определяются эмпирически на этапе отработки режима работы ингаляционной системы.

В тех случаях, когда целью исследования является более общее решение профилактической задач В рамках развития теоретических основ нанотоксикологии, или же уточнение токсикологической характеристики какоголибо конкретного вида НЧ для оценки рисков, создаваемых смешанными промышленными аэрозолями, в составе которых этот вид НЧ (в особенности элементно-оксидных) обнаруживается в разных количествах, использование его коммерческих аналогов нежелательно в связи с нередким модифицированием поверхности последних. Кроме того, для решения зтих задач предпочтительны такие способы генерирования НЧ, которые обеспечивают ингаляционное воздействие на животных не вторичного, а только образованного в ходе этого воздействия «свежего» аэрозоля НЧ, то есть позволяют моделировать важнейшую особенность реальной аэрогенной экспозиции к НЧ человека в производственных условиях с той степенью неизбежной агрегации и изменение поверхности НЧ, которая имеет место в этих условиях.

Конкретные технические решения при создании генераторов НЧ такого типа, известные из научной литературы и собственного опыта разработчиков данных МР, могут быть различными (например, расплавление и испарение сверхчистого металла при высокой температуре или при электро-искровом разрушении в инертной газовой среде с последующей конденсацией НЧ и их окислением в потоке холодного воздуха; высокотемпературное разложение паров подходящего элементо-органического соединения с теми же последующими стадиями), однако все они имеют в основе те же физические и химические процессы, которые приводят к образованию НЧ в металлургических и сварочных производствах. Это

обстоятельство важно потому, что условиями образования НЧ во многом определяются их геометрические и химические характеристики, от которых существенно зависят их токсикокинетика и токсикодинамика.

Продолжительность ингаляционных экспериментов

Общая продолжительность хронического ингаляционного воздействия аэрозолей НЧ в эксперименте определяется при его планировании в соответствии с поставленными задачами, а также с учетом национальных и международных указаний или официальных рекомендаций, относящихся решению некоторых из этих задач (в частности, гигиенического нормирования), если такие нормативнометодические документы существуют. Однако и в этом случае рекомендуемые ими сроки должны рассматриваться лишь как минимальные, если имеются основания для проведения более длительных экспериментов.

Так, например, если учесть, что средняя продолжительность жизни крысы равна 30 месяцам, типичный ингаляционный эксперимент, длящийся 4 месяца, то есть всего 13 % от этой продолжительности, слишком краток в сопоставлении с трудовым периодом человека даже в производствах с вредными условиями труда (в России около 50 % средней продолжительности жизни). К тому же, 4-часовая максимальная длительность разовой экспозиции животных в системах «только нос» намного короче даже сокращенного рабочего дня, что дополнительно занижает суммарную хроническую экспозицию в эксперименте по сравнению с реальной. Из всех этих соображений можно рекомендовать проведение хронических ингаляционных экспериментов продолжительностью до 10-12 В этот срок не входят несколько недель, необходимых для месяцев. предварительной адаптации животных к спокойному пребыванию в «пенале». Если ставится задача выявления канцерогенного действия, то и этот срок должен быть удлинен.

Как теоретические соображения, так и уже имеющийся опыт проведения экспериментов такого типа, свидетельствуют о том, что динамическое равновесие между первичным отложением НЧ при дыхании, их транслокацией внутри организма и элиминацией из него (с установлением так называемого плато

накопления) может достигаться быстрее, чем при действии частиц диапазона, причем неодинаково быстро для НЧ микрометрового разных размеиров и разной химический природы. Поэтому в пределах вышеуказанного общего периода ингаляционной НЧ-экспозиции необходимо предусмотреть 1-2, а по возможности, и больше промежуточных сроков выведения из эксперимента животных как для определения у них задержки НЧ в легких и других органахмишенях и содержания НЧ (или соответствующего химического элемента) в моче и кале, так и показателей состояния организма. В те же сроки аналогичные проводятся крыс, выводимых контрольной (ложно исследования V ИЗ экспонированной) группы.

Показатели эффекта ингаляционного воздействия аэрозолей НЧ

Содержание НЧ (или соответствующего химического элемента) в легких и органах-мишенях, a также В выделениях должно определяться других высокочувствительными методами – прежде всего, различными вариантами атомно-адсорбционной и атомно-эмисиионной спектроскопии, а для веществ парамагнетиков – также по спектру электронного парамагнитного резонанса. Сочетание этих двух подходов целесообразно потому, что суммарное накопление элемента в органе (определяемого при ААС или АЭС) обусловливается не только образующим НЧ и определяемым методом ЭПР (если его веществом, использование, как указано, возможно), но и свободными или вторично связанными ионами, образующимися при всегда происходящем более или менее активном растворении НЧ в биологических средах. Дополнительная важная информация о накоплении НЧ в органах и тканях и их внутриорганной врутриклеточную) локализации (включая получается с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Все показатели распределения НЧ в организме оцениваются при исследовании легких, трахеобронхиальных лимфоузлов, основных органах вторичного накопления всех НЧ, проникших в кровоток (печень, селезенка), головного мозга, в ольфакторную зону которого НЧ, первично отложившиеся в носовых ходах, попадают периневрально, в почках, как органе выделения рас

творивлшихся НЧ, а также в тех органах, токсическое поражение которых специфично для рассматриваемого НЧ образующего химического элемента или представляет особый интерес в свете задач эксперимента. В этих же органах целесообразно качественное и морфометриическое изучение гистопатологических нарушений, выявляемых при световой и желательно электронной микроскопии.

Наряду с этим, важнейшую роль, как и при любом другом воздействии на организм через органы дыхания, играет проведение бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) с оценкой цитологических и биохимических показа сдвигов в получаемой жидкости (БАЛЖ). Это исследование рекомендуется проводить через сутки после завершающей НЧ-экспозиции.

В набор функциональных критериев оценки состояния организма и его систем, как В любом хроническом токсикологическом отдельных эксперименте, включаются интегральные и специфические показатели. Сдвиги первых, как обычно, отражают стресс-обусловленные нарушения гомеостаза, но особенностью токсических эффектов действия НЧ является то, что в этом случае говорить специфичности показателей, отражающих не только о можно особенности действия конкретного НЧ-образующего химического элемента (например, нарушений порфиринового оммена и кроветворения при действии свинец-содержащих НЧ), но и об эффектах, особо выраженных при действии НЧ, но менее выраженных или вообще не выявляемых при действии их химических аналогов микрометровых размеров. Речь идет, прежде всего, о показателях гепатотоксичноси, спленотоксичности И нефротоксичности, a также полиорганной генотоксичности *in vivo*, которые присущи практически всем НЧ, проведенных большому опыту субхронических экспериментов, судя ПО основанных на повторных внутрибрюшинных инъекциях, и на которые поэтому должно обращаться внимание во всех планируемых хронических ингаляционных исследованиях.

Резюме

В целом, как защитное реагирование на отложение двух изученных видов металлооксидных наночастиц в глубоких дыхательных путях, так и признаки развития хронической интоксикации при ингаляционном воздействии соответствует тем общим закономерностям, которые характерны для их действия, соответственно, при разовой интратрахеальной инстялляции и при повторных внутрибрюшинных введениях.

Однако значительно менее высокая дозовая нагрузка и экспозиционный масштабах период, более существенный В продолжительности жизни биологического обусловливают некоторые вида, важные количественные различия указанных процессов и делают проведение хронических ингаляционных экспериментов целесообразным, особенно для более надежного обоснования предельно допустимых концентраций таких наночастиц в воздухе.

Выявлен и при внутрибрюшинной, и при ингаляционной затравке наночастицами NiO такой специфичный эффект токсичности никеля как сдвиги показателей клеток красной крови, свидетельствующие о фазовой стимуляции эритропоэза. Вместе с тем, впервые обнаружен фазовый характер реагирования организма на хроническую экспозицию к наночастицам и с некоторыми другими проявлениями кажущейся адаптации к такой экспозиции.

Говоря принципиальном эффектов же сходстве ряда других 0 субхронического внутрибрюшинного (CM. Главу 4) И хронического ингаляционного воздействия, особо следует отметить генотоксический эффект организменного уровня, выявляемый даже при тех низких уровнях хронической экспозиции, при которых системная токсичность выражена довольно слабо, и не проявляющий никакой тенденции к адаптации.

В обоих хронических ингаляционных экспериментах отмечена парадоксально выраженность низкая пульмонарной патологии ПО пневмокониотическому типу, что противоречит их высокой цито токсичности, но соответствует малой хронической задержке изученных наночастиц в легких. Основной причиной этого может быть относительно высокая растворимость металлооксидных наночастиц в биологических средах. Подтверждением такой гипотезы могут послужить результаты математического моделирования кинетики указанной задержки, которые излагаются в следующей Главе диссертации.

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВКЛАДА ПРОЦЕССА РАСТВОРЕНИЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ И МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЗАДЕРЖКЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИХ В ОРГАНИЗМЕ

6.1. Оценка зависимости токсичности наночастиц от их растворимости по образующему наночастицу элементу

Эта физико-химическая характеристика любой металлической или металлооксидной НЧ, в свою очередь, зависит как и от ее размера, так и от химической природы.

В экспериментальных исследованиях, изложенных в этой диссертационной работе, в организм животных всегда вводятся интратрахеально (Глава 3), ингаляционно (Глава 5) или интраперитонеально (Глава 4) металлсодержащие НЧ с небольшой, а иногда и практически нулевой раствормостью в воде, в биологической среде они постепенно, хоть и с разной скоростью растворяются. Об этом свидетельствуют, прежде всего, данные *in vivo*, показывающие, что суммарное содержание соответствующего металла в той или иной ткани и особенно в моче выше его содержания в форме персистирующих НЧ (Глава 4, данные эксперимента с нано-магнетитом). Об этой «солюбилизации», казалось бы, совершенно не растворимых НЧ свидетельствуют и результаты наших экспериментов *in vitro*, в которых такие металлические НЧ инкубировались в той или иной модельной среде.

Хорошо известно, что вокруг различных НЧ *in vivo* образуется так называемая белковая «корона» (Konduru N.V. et al., 2017; Pederzoli F. et al., 2017; Barbero F. et al., 2017), которая с одной стороны стабилизирует био-суспензию как дисперсионную системую, а с другой – способствует растворению НЧ. Можно

предположить, что ионы металлов, выходящие с поверхности наночастицы в какую-то биосреду, затем связываются белками, в результате чего снижается вероятность их реабсорбции той же поверхностью. Поэтому динамическое равновесие между релизом и реабсорбцией этих ионов сдвигается в сторону первого, и частица постепенно растворяется. Следует к том уже учесть, что если обычно принятое в эксперименитах *in vitro* добавление 10 % сыворотки создает концентрацию белка в среде всего около 5 мг/мл, то в большинстве жидкостей организма она на порядки выше (Barbero F. et al., 2017) и поэтому можно думать, что солюбилизация тех же НЧ *in vivo* еще более выражена, чем в модельных экспериментах.

Важная токсикологическая роль соотношения между био-растворимостью и био-персистенцией различных НЧ признается многими авторами (например, Utembe W. et al., 2015), но без конкретного рассмотрения этой проблемы. Исходя из экспериментальных данных диссертационной работы, многие металлсодержащие НЧ, в равной мере стабильные в водных суспензиях, имеют далеко не одинаковую скорость растворения в модельных биологических средах, чем можно хотя бы отчасти объяснить существенные различия накопления их во внутренних органах.

Чем меньше частица, тем быстрее она растворяется в этих вторичных депо из-за ее огромной удельной поверхности. Кроме того, мельчайшие НЧ, которые судя по нашим данным, более цитотоксичны для альвеолярных макрофагов, предположительно более цитотоксичны и для любых других клеток, внутрь которых они попадают, включая резидентные макрофаги (например, клетки Купфера) и, следовательно, в большей степени приводят к гибели клеток (с возможным выделением НЧ обратно в кровоток). Баланс между этими противоположно действующими механизмами токсикокинетики зависит от многих переменных, но, по крайней мере, в экспериментах, рассмотренных выше, установлено, что для некоторых более крупных металлооксидных НЧ нагрузка на орган (и, следовательно, неблагоприятное воздействие на этот орган) больше, чем для меньших металлооксидных НЧ той же химической природы. Однако кинетика солюбилизации этих наночастиц не только связана с их размером, но и зависит от их химической природы. Так, например, продемонстрировано, что НЧ серебра были более растворимы, чем НЧ золота при одинаковом их размере (Глава 4).

Если, с одной стороны, солюбилизация НЧ in vivo в целом является объяснением их низкой задержки в организме, то с другой, внутриклеточное растворение металлических НЧ с выделением токсичных ионов вблизи ультраструктурных и молекулярных мишеней их воздействия, является одним из широко признанных первичных механизмов, объясняющих их особенно высокую токсичность («эффект троянского клоня»). Например, была продемонстрирована ключевая роль этого механизма в отношении цитотоксичности ZnO-HЧ (Tada-Oikawa S. et al., 2015). Кроме того, вполне вероятно (хотя и не доказано насколько нам известно), что более быстрое растворение напрямую, депонированных в том или ином органе металлических НЧ с ионной резорбцией в кровоток является необходимым условием их более высокой системной токсичности.

6.2. Построение и идентификация многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной ткани

Теоретические представления об аэродинамических механизмах, определяющих первичное отложение ингалируемых НЧ преимущественно в так называемой пульмонарной, или альвеолярной области легких, а также в носовых ходах, давно устоялись в науке. Они были включены в общеизвестную модель Комитета Радиационной Защите (ICRP. 1994). Международного ПО a последующие корректировки количественной оценки ЭТОГО отложения. основанные на использовании различных математических моделях, не могут быть названы принципиальными. Между тем, именно как принципиальные должны

быть охарактеризованы различия взглядов разных исследователей на роль физико-химических физиологических И механизмов, контролирующих дальнейшую судьбу НЧ, отложившихся при дыхании. В частности, конкретных экспериментальных и модельных оценок ее зависимости от растворения металлических НЧ в организме пока имеется недостаточно для каких-либо обобщений. Если, например, эта роль была экспериментально оценена как малая по отношению к НЧ TiO₂ (Creutzenberg O., 2013), то это является скорее частным случаем, чем общей закономерностью. Отметим, что исследователи (Adamcakova-Dod A. at al., 2014), проведшие подострую и субхроническую ингаляционную экспозицию мышей к НЧ ZnO, выявили начальную фазу существенного повышения концентрации Zn²⁺-иона в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ), что косвенно свидетельствует о растворении этих НЧ уже на свободной поверхности глубоких дыхательных путей и альвеол еще до их пенетрации в легочный интерстициум.

Между тем, автор диссертации (Kolanjiyil A.V., 2013), разработавший многокамерную системную модель кинетики отложении И задержки ингалируемых НЧ в легких, парараметры которой были им оценены на базе различных опубликованных экспериментальных исследований других авторов с Ме-НЧ при, правило, краткосрочной ингаляции разными как В малых концентрациях, принял нерастворимость этих НЧ в качестве одного из исходных постулатов. Тем не менее, сам он в своей модели принимает, в полном соответствии с превалирующей в литературе традицией, альвеолярный макрофаг (АМ) в качестве единственного эффектора фагоцитарного механизма легочного клиренса наночастиц. На самом же деле, усиленная мобилизация нейтрофильнрых лейкоцитов (НЛ) в ответ на пульмонарное отложение любых частиц, включая наноразмерные, давно и хорошо известна, но обычно характеризуется как признак воспаления (например, Renwick L. et al., 2004; Stoeger T. et al., 2006; Sager T.M. et al. 2007; Grassian V.H. et al., 2007; Neuberger M., 2007; Warheit D.B. et al., 2009; Liu J. et al., 2016).


Рисунок 6.2.1 – Структура многокамерной модели кинетики легочной задержки, перераспределения и клиренса нерастворимых пылевых частиц, отложившихся при дыхании в пульмонарной области легких; ω - постоянная отложения, **k**_{ji} константа скорости пререноса частициз камеры X_i в камеру X_j (Renwick et al., 2004; Katsnelson et al., 1994;1997)

Между тем, большим числом экспериментов (Старикова С.К. с соавт., 1970; Привалова Л.И., 1979; Привалова Л.И., 1990) было доказано, что нейтрофильный цитотоксичных пылевых частиц является важным механизмом фагоцитоз макрофага, роль частичной компенсации повреждения ими которого как легочного клиренса несомненна. Упомянутая основного участника выше многокамерная модель системы задержки практически нерастворимых пылевых частиц, схема которой показана на Рисунке 6.2.1, была разработана на основе именно этих представлений.

Подтверждением их обоснованности может служить то, что при управляющих вмешательствах, имитирующих различия фагоцитарной реакции легких на отложение различных пылевых частиц с большим или меньшим вкладом НЛ, эта модель успешно прогнозировала кинетику хронической задержки в легких и лимфоузлах крысы при длительной ингаляции пыли неодинаковой цитотоксичности (кварцит, стандртный кварц DQ₁₂, диоксид титана), а также при ингаляции той же самой кварцитной пыли на фоне такого мощного антцитотоксического агента как глютамат (Katsnelson B.A. et al., 1992; Привалова Л.И., 1990; Katsnelson B.A. et al., 1997).

Отметим однако, что неодинаковая задержка в легких кварцитной пыли и некоторых аэрозолей аморфного кремнезема (Петин Л.М., 1978; Подгайко Г.А., 1982; Katsnelson B.A. et al., 1984) свидетельствует о том, что и для малорастворимых микрометровых частиц роль растворения как механизма самоочищения легких от них не всегда является пренебрежимо малой. Этот механизм представляется тем более важным, когда речь идет о металлических/ металлооксидных НЧ, поскольку и цитотоксичность и растворимость этого класса аэрозолей варьируют в широких пределах.

Для проверки верности вышеизложенных представлений применительно к ингаляционной токсикологии металлооксидных нано-аэрозолей было решено провести эксперименты с НЧ оксида железа Fe₂O₃, которые являются основным по массе компонентом сварочных дымов и эмиссий сталеварения, а тем самым, одним из гигиенически наиболее значимых примеров металлических НЧ.

Адаптация системной модели

При расчете постоянной массы наночастиц, первично отлагающихся на свободной поверхности так называемой пульмонарной области глубоких дыхательных путей крысы, для всех подопытных групп были приняты: (а) взвешенная по времени средняя концентрация Fe_2O_3 во вдыхаемом воздухе, равная 1,10 мг/м³; (б) минутный объем легочной вентиляции 100 мл, что в 1,3 раза выше минимальной величины, найденной в литературе – 78 мл (Maulderly J.L., McCunney R.G., 1997) и в 2,1 раза ниже максимальной – 210 мл (Bellmann B. et al.,1991); (в) 52 %-ное фракционное отложение НЧ в пульмонарной области, что близко к минимальной оценке по разным методам (Kolanjiyil A.V., 2013). Отметим, что ориентировочный характер параметров (б) и (в) не только

218

неизбежен, принимая во внимание противоречивость имеющихся в литературе оценок, но и вполне допустим для системной модели подобного рода.

Структура многокамерной модели кинетики частиц на свободной поверхности глубоких дыхательных путей

Частицы, захваченные альвеолярными макрофагами, могут либо уходить на мукоцилиарный эскалатор, либо в результате гибели макрофагов вновь освобождаться, т.е. возвращаться в камеру *X*₁.

Пути выхода частиц из камеры *X*₁:

-поглощение альвеолярными макрофагами (в камеру *X*₂);

поглощение нетрофильными лейкоцитами (в камеру X₃);

– переход в легочный интерстиций (в камеру *X*₄);

– выход на мукоцилиарный эскалатор (в камеру *X*₇) и далее в ЖКТ.

Частицы, захваченные нетрофильными лейкоцитами, переходят на мукоцилиарный эскалатор и далее в ЖКТ.

Структура многокамерной модели кинетики частиц в пределах легочного интерстиция

Частицы, попавшие в легочный интерстиций, могут оставаться свободными (камера *X*₄) или же поглощаться интерстициальными макрофагами (камера *X*₆).

Выход свободных частиц из интерстиция возможен либо по коротким, либо по длинным путям лимфодренажа. В первом случае частицы попадают на мукоцилиарный эскалатор (камера X_7) и далее в ЖКТ, во втором – во внелегочные лимфоузлы (камера X_5).

Частицы, захваченные итерстициальными макрофагами, могут либо в фагоцитированном состоянии выходить на свободную поверхность легких, пополняя камеру *X*₂, либо в результате гибели макрофагов вновь освобождаться и возвращаться в камеру *X*₄.

Кинетические константы (параметры модели)

Кинетическая константа k_{ji} есть доля вещества, выводимая из камеры *i* в камеру *j* за единицу времени. Например, k_{54} – это *доля* вещества, находящегося в камере X_4 в момент времени *t*, которая за единицу времени переходит в камеру X_5 .

Масса вещества, переносимого этим потоком за единицу времени, будет равна k_{54} · X_5 .

Параметры модели k_{ji} , скорей всего, не являются константами в математическом смысле этого слова. Величины их должна зависеть от состояния органов, тканей и биосред, потоки между которыми они определяют. Но в моделях мы пользуемся усредненными по времени значениями этих параметров и считаем их константами.

Эффективность модели обусловлена правильным выбором ее структуры

Действительно, помимо центральной камеры и возможных путей освобождения легочной области от ксенобиотика, модель включает также камеры и потоки, специфичные именно для цитотоксичных пылей – камеры X_2 (частицы в альвеолярных макрофагах) и X_3 (частицы в нейтрофильных лейкоцитах).

Идентификация модели

Эта модель была ранее идентифицирована (Katsnelson B.A. et al., 1997) для оптимальной имитации экспериментальных данных о задержке SiO₂ в легких и легочно-ассоциированных лимфоузлах в процессе хронической ингаляции кварца DQ12. Этот конкретный выбор был продиктован как ожиданием высокой цитотоксичности HЧ Fe₂O₃, так и сходными условиями экспозиции, которая в эксперименте с DQ12 была проведена на протяжении от 3 до 24 мес. по 30 часов в неделю при той же самой средней концентрации 1 мг/м³.

специфике Адаптация этой модели К настоящего эксперимента осуществлялась на основе подхода, разработанного ранее для решения аналогичных задач системного моделирования (Katsnelson B.A. et al., 1992; 1994; 1997). Этот подход основан на компьютерных программах, сочетающих формальную итеративную процедуру с определенными ограничениями или, наоборот, прямыми заданиями, касающимися того или иного изменения коэффициентов модели по знаку и/или величине. Эти ограничения и задания должны быть оправданы теоретическими представлениями о закономерностях собственными функционирования моделируемой системы, а также или имеющимися в литертатуре экспериментальными данными.

Критерием успешности этой процедуры (так называемой идентификации модели) является удовлетворительная имитация динамики задержки, то есть накопления хронически ингалируемых частиц в ткани легких и лимфоузлов. Необходимо понимать однако, что основная цель системного моделирования состоит не в надежном предсказании какого-то количественного показателя как такового, а в подтверждении внутренней непротиворечивости (консистентности) той гипотезы о структуре рассматриваемой системы и процессах, ее контролирующих, которая воплощена данной моделью. Поэтому имитация, о которой идет речь, должна быть адекватной в главном, но не обязательно полной в деталях.

Например, имеются все основания допустить, что чем мельче частицы, тем вероятнее их диффузия через биологические мембраны (в отношении пенетрации в кровь из альвеол 22 нм Fe₂O₃, введенных интратрахеально, это показано в эксперименте). Поэтому представлялось необходимым увеличить по сравнению с исходной моделью константу скорости переноса свободных HЧ в легочный интерстициум (на модели Рисунке 6.2.1 это константа k_{41} переноса из камеры X₁ в камеру X₄). Даже при отсутствии оснований для априорного назначения кратности этого изменения, сама по себе обязательность его, причем именно в сторону увеличения, может служить примером того ограничения свободы итеративной процедуры, о котором только что было сказано.

Второй пример касается введения в модель конечного значения k_{31} константы скорости переноса из камеры Х₁ в камеру Х₃, описывающего вторичное освобождение НЧ при разрушении НЛ, ИХ фагоцитировавших. При моделировании задержки вышеперечисленных пылей она была принята равной нулю (почему соответствующая связь между указанными камерами и не была показана схемой модели на Рисунке 6.2.1). Это объяснялось тем, что нагрузка единичного НЛ микрометровыми пылевыми частицами была мала по сравнению с единичным АМ и поэтому не приводила к существенному повреждению и разрушению клетки. Однако экспериментальные результаты интратрахеального воздействии НЧ Fe₃O₄, показали, что они поглощаются единичным НЛ очень

жадно (хотя и менее жадно, чем единичным АМ).

Была исследована растворимость оксида железа Fe_2O_3 , собранного на выходном микропористом PSI фильтре (Performance Systematix, Inc. – USA) из воздуха, отсасываемого от ингаляционной установки. Судя по кинетике снижения периодически измеряемого ЭПР сигнала, соответствующего иону Fe^{2+} (с помощью Bruker EMXplus EPR Spectrometer, USA при температуре ~177 K), HЧ Fe_2O_3 практически не растворимы ни в деионизированной воде, ни в изотоническом растворе NaCl, но постепенно растворяются в испытанных биологических средах (Рисунок 6.2.2).



Рисунок 6.2.2 – Кинетика снижение интенсивности (в произвольных единицах) ЭПР-сигнала от НЧ Fe₂O₃, собранных на выходном PSI – фильтре, при его инкубации (а) в воде; (б) в супернатанте БАЛЖ; (в) в стерильной бычьей сыворотки крови.

Кинетика этого растворения в супернатанте жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) у неэкспонированных крыс,

аппроксимируется экспоненциальной функцией с коэффициентом скорости растворения k = 32 нед⁻¹, а в стерильной бычьей сыворотке – двумя экспоненциальными функциями с $k_1 = 118$ нед⁻¹ и с $k_2 = 4,9$ нед⁻¹.

Результаты вышеописанного эксперимента *in vitro*, выявившие растворимость HЧ Fe₂O₃ в биологических жидкостях, позволяют предположить, что они могут растворяться *in vivo*, где бы ни находились после отложения. Однако для учета роли этого процесса в кинетике легочной задержки мы приняли достаточным (и, как выяснилось далее, необходимым) включить в структуру модели элиминационные потоки (Рисунок 6.2.3), обусловленные растворением свободных (то есть внеклеточных) частиц, идущие из камер X_1 и X_4 .

Выбирая величину константы скорости s_1 для первого из этих потоков, мы ориентировались на константу скорости растворения НЧ Fe₂O₃ с фильтра в БАЛЖ (равную 32 нед⁻¹), поскольку эта жидкость близка к той среде, в которой частицы плавают на свободной поверхности пульмонарной области легких. Оговоримся однако, что точного равенства этих двух констант в принципе не может быть и потому, что указанная естественная среда была разбавлена водой, которой производится лаваж, и потому, что пульмонарной области достигают при ингаляции наиболее мелкие, то есть наиболее растворимые НЧ (в то время как на фильтре осаждались НЧ из камеры без предварительной сепарации по размерам), и потому, что какая-то часть этих НЧ, проникшая в толщу фильтра, оказывается мало доступной для контакта с растворителем.

Задать ориентир для выбора значения s_4 - константы скорости элиминационного потока из камеры X₄ еще сложнее, прежде всего, потому, что для оценки этой величины *in vitro* затруднительно найти модельную жидкую среду, достаточно близкую по составу и свойствам к тканевой жидкости крысиных легких. Использованная в этом качестве стерильная бычья сыворотки крови кажется сравнительно неплохим решением задачи, но разумеется, далеким от «точности». К тому же, кинетика растворения в этой среде частиц с фильтра апроксимировалась двухэкспоненциальной функций времени. Мы приняли допущение, что те мельчайшие НЧ, с которыми может быть связана быстрая фаза растворения, *in vivo* в значительной степени растворились еще до пенетрации через альвеолярную мембрану. Поэтому константа s_4 должна бы быть существенно ниже константы s_1 и не слишком отличаться от константы скорости медленной фазы растворения *in vitro* (равной 4,9 нед⁻¹).

В итоге итерационная процедура, ориентированная на вышеприведенные оценки, выбрала значения рассматриваемых констант равными для $s_1 = 30$ нед⁻¹ и для $s_4 = 2.5$ нед⁻¹.

Для элиминации НЧ из легочно-ассоциированных лимфоузлов, представленных в модели камерой X_5 , мы условно объединили растворение в один поток с прямой пенетрацией НЧ в лимфу и кровь, что и может оправдать найденное итерацией более высокое по сравнению с последней величиной значение константы $s_5 = 6$ нед⁻¹.



Рисунок 6.2.3 – Структура многокамерной модели кинетики легочной задержки, перераспределения и клиренса наночастиц Fe₂O₃, отложившихся при дыхании в пульмонарной области легких, с учетом их растворимости.

Как видно из данных Таблицы 6.2.1 (обсуждение которой, представлено в Главе 3), судя по отношению НЛ/АМ интратрахеально введенные частицы Fe₃O₄ диаметром 10 нм или даже 50 нм существенно более цитотоксичны, чем частицы диаметром 1,1 мкм.

Правда, при интратрахеальном введении НЧ Fe₂O₃ мобилизация НЛ была намного менее выраженной, чем при введении кварца DQ₁₂, однако при практически равном вовлечении АМ в элиминацию частиц обоего рода даже существенное межгрупповое различие вовлеченности нейтрофильного фагоцитоза едва ли играло важную токсикокинетическую роль. Другими словами, у нас не оказалось надежно экспериментально обоснованных количественных ограничений для подбора программой итерации тех констант модели, которые связаны с фагоцитозом частиц, однако имелись некоторые априорные ограничения и ориентиры.

Таблица	6.2.1 –	Клеточный	состав	жидкости	бронхоальвеолярного	лаважа,
полученн	юй у крыс	с через 24 час	са после	воздействи	я НЧ Fe ₂ O ₃ ($\overline{X_{cp}} \pm S_x$)	

Ввеленное		Число клеток х	10 ⁶							
вещество	Bce	Альвеолярные макрофаги (АМ)	Нейтрофильные лейкоциты (НЛ)	НЛ/АМ						
после завершающей экспозиции 3-месячного ингаляционного периода										
HЧ Fe ₂ O ₃	2,45±0,33*	1,96±0,28	0,46±0,08*	0,25±0,02*						
Контроль	1,47±0,23	1,35±0,21	0,11±0,03	0,08±0,02						
	после интр	атрахеального введен	ния (0,3 мг в 1 мл)							
HЧ Fe ₂ O ₃	3,59±0,24* •	2,69±0,24	0,84 ±0,09*•	0,35±0,06*						
Кварц DQ ₁₂	5,22±0,32*	3,09±0,24*	2,09±0,41*	0,85±0,28*						
Вода (контроль)	2,16±0,26	2,04±0,24	0,12±0,03	0,05±0,01						

Примечание:

* — статистически значимое различие с группой «контроль»; • — с группой «DQ₁₂» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Так, исходя из более высокой фагоцитарной активности AM по сравнению с НЛ по отношению к любым частицам, в том числе, к железооксидным НЧ, было задано условие $k_{21} > k_{31}$. Исходя из того, что скорость вторичного освобождения фагоцитированных частиц в результате разрушения клеточного пула естественно ниже скорости их поглощения, можно было задать условия $k_{21} > k_{12}$, $k_{31} > k_{13}$ и k_{64} $>k_{46}$. Учитывая, что относительно низкая нагрузка частицами единичного НЛ делает вероятность его разрушения частицами невысокой по сравнению с единичным AM, мы приняли условие $k_{13} << k_{12}$ (как уже отмечено выше, в исходной модели это разрушение было не учтено вовсе)

Вместе с тем, нам неизвестны данные о сравнительной фагоцитарной активности AM и интерстициального макрофага, а соотношение между численностью наличных пулов этих клеток является заведомо динамичным, что в совокупности делает невозможным задать условие того или иного неравенства констант k_{21} и k_{64} . Можно было лишь предположить, что они скорее не равны, чем одинаковы. С другой стороны, как исходная, так и модифицированная модель принимают, что непосредственное токсикокинетическое последствие разрушения легочного макрофага любой локализации или нейтрофила (возвращение частиц из внутриклеточного в свободное положение) не зависит от того, какой вариант клеточной смерти (апоптоз, аутофагия или некроз) привел к указанному разрушению фагоцитов. Даже если это допущение несколько упрощает реальность, уместно подчеркнуть еще раз, что подобные упрощения при построении модели системы не только неизбежны, но и не лишают ее познавательной ценности в рамках поставленной задачи.

Однако итерационная процедура, корректируемая всеми этими ограничениями, допущениями и условиями, включая обоснованное выше требование увеличить константу k_{41} , не достичь бы смогла хотя приблизительной имитации динамики нарастания задержки частиц в легких. Поэтому включили в структуру модели обоснованные выше выходы из системы, связанные с растворением НЧ, а затем повторно запустить процедуру идентификации остальных параметров модифицированной модели с учетом всех вышеизложенных условий и ограничений.

227

Как можно увидеть на Рисунке 6.2.4, в этом случае модель действительно прогнозировала характерную для токсикокинетики 1-го порядка кривую накопления с постепенным выходом на плато. При этом, ни одна из точек не отклоняется от нее статистически значимо. Таким образом, эксперимент дал вполне удовлетворительное подтверждение консистентности модели, а тем самым - и той теории, на базе которой она была первоначально развита и в настоящее время модифицирована.⁵ Особо следует подчеркнуть, что алгоритм и результат этого модифицирования вполне согласуются с признанием важной токсикокинетической роли постепенного растворения НЧ in vivo - во всяком случае, для частиц Fe₂O₃ в нижнем диапазоне наноразмерности.



Рисунок 6.2.4 – Временной ход накопления Fe₂O₃-HЧ в легких крыс, предсказываемый модифицированной многокамерной моделью на 10-месячный период реально осуществленных ингаляционных экспозиций (сплошная линия) и в случае его удлинения до 20 мес. (пунктирная линия). По оси абсцисс отложенры недели от момента начала экспозиций, по оси ординат - абсолютное содержание

Fe₂O₃ в легких, мкг. Экспериментальные показатели обозначены с 95 % ДИ.

⁵ Целесообразно напомнить, что речь идет о модели системы, а не о модели данных, которая волне удовлетворительно аппроксимировала бы те же самые экспериментальные результаты линейной зависимостью. Смысл и назначение этих двух принципов моделирования совершенно различны.

Отметим, что именно этот механизм самоочищения легких является наиболее вероятным объяснениям того, почему накопление оксида железа в легких оказалось в 15-16 раз ниже, чем накопление диоксида кремния при сопоставимой экспозиции к пыли кварца DQ₁₂: например, после 3 месяцев ингаляции 13,5 мкг и 207 мкг, соответственно, а после 10 месяцев - 34,6 мкг и 550 мкг, соответственно. К сожалению, мы располагаем показателем содержания Fe₂O₃ в легочно-ассоциированных лимфоузлах только по объединенной ткани всех крыс группы к 10-месячному сроку эксперимента. В расчете на одно животное оно составило 0,003 мкг, что близко к модельной имитации (0,004 мкг).

Рисунки 6.2.5 и 6.2.6 (которые были уже представлены в Главе 4) дают ΗЧ электронно-микроскопической визуализации накопления пример В альвеолоцитах типа I и типа II, которое с рассматриваемых в данной Главе позиций легочной токсикокинетики частиц является промежуточной фазой их транслокации через альвеолярную мембрану, чему в нашей модели соответствует переход из камеры X₁ в камеру X₂. Этой моделью он рассматривается, по сути диффузия, пассивная но нельзя исключить дела, как какую-то роль физиологического (клеточно-опосредованного) компонента. С другой стороны, участвующие в нем клетки, образующие альвеолярную мембрану, вероятно, могут быть повреждены действием цитотоксичных частиц. Во всяком случае, мы видим в альвеолоците типа II, показанном на Рисунке 6.2.6, выраженную дезорганизацию мембран мультиламеллярного тельца и можем предположить, что такое повреждение этих органелл, участвующих в образовании сурфактанта, может привести к нарушениям легочной механики.



Рисунок 6.2.5 – Альвеолоцит типа I в легких крысы после 6 мес. ингаляции наночастиц, накопление которых в клетке указано стрелками. ПЭМ, увеличение х 95 370.



Рисунок 6.2.6 – Альвеолоцит типа II в легких крысы после 6 мес. ингаляции наночастиц, накопление которых в клетке указано стрелками, а звездочками – дезорганизация мембран мультиламеллярного тельца. ПЭМ, увеличение х 32 010.

Мы находим НЧ также в ольфакторной области головного мозга, где они обнаруживаются только в миелиновой оболочке внутримозговых нервных волокон и сопряжены с очаговой демиелинизацией. Такая, казалось бы, странная локализация может быть объяснена транслокацией НЧ со стороны ольфакторного эпителия носовой полости, в которой они, как хорошо известно (Kolanjiyil A.V., 2013), отлагаются в значительной степени, напрямую в мозг вдоль волокон ΗЧ обонятельного Этот транслокации был нерва. путь различных непосредственно прослежен многими экспериментаторами (например, Oberdörster G.et al., 2004; Elder A. et al., 2006; Kao Y.Y. et al., 2012).

Однако общее накопление Fe₂O₃ в мозгу наших крыс оказалось определения ЭПРнедостаточным количественного помощью ДЛЯ С спектроскопии, позволяет идентифицировать рассматриваемый ЧТО не токсикокинетический механизм в структуре многокамерной модели.

На основании вышеизложенного, была предложена и получила патент РФ на промышленный образец (№100783) общая схема многокамерной модели распределения и задержки в организме металлосодержащих НЧ отложившихся в глубоких дыхательных путях с учетом физиологических и физико-химических механизмов, предположительно ее контролирующих: растворимость наночастиц, способность наночастиц проникать через биомембраны, вызывать реакцию альвеолярного фагоцитоза и активно фагацитироваться (Рисунок 6.2.7).



Рисунок 6.2.7 – Схема многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной области

Задачей следующего этапа, была еще одна проверка того утвержденния, что развитая токсикокинетическая модель, хотя и может потребовать дополнительной изменений для условий воздействия и некоторых свойств конкретных НЧ, остается в целом адекватной и, тем самым, объективно отражающей ключевые механизмы, контролирующие элиминацию наночастиц и задержку их в легких. С этой целью мы использовали соответствующие результаты эксперимента, проведенного с НЧ NiO при хронической ингаляционной экспозиции на относительно низком уровне. Токсические эффекты этой экспозиции рассматриваются в Главе 5.

Переходя к моделированию для хронической ингаляционной экспозиции крыс к НЧ NiO, было естественным принять за отправную точку именно этот вариант модели, указанным образом обоснованный для НЧ Fe₂O₃, и некоторые ее параметры, опираясь на аналогичные сравнительные оценки клеточности БАЛЖ и солюбилизации НЧ. При этом, как и во всех предыдущих работах этого направления (Katsnelson B.A. et al., 1992; 1994; 1997) мы придерживались того принципа, что недопустимо подгонять модельный прогноз задержки под фактические результаты с помощью изменения каких-либо других констант скорости переноса частиц, для которого нет подобных экспериментальных или хотя бы твердо обоснованных теоретических предпосылок.

Вместе с тем, было сочтено возможным некоторое варьирование величины отложения частиц на свободной поверхности дыхательных путей (ω во всех схемах модели на Рисунках представленных выше), поскольку эта величина могла быть определена только весьма приблизительно.

Что же касается особенностей процесса задержки НЧ NiO, с которыми была связана необходимость такой адаптации, и принятые способы реализации последней заключаются в следующем:

 Растворимость NiO-NP в организме должна быть принята еще более высокой, чем для НЧ Fe₂O₃, хотя и в этом случае она (судя по кинетике растворения *in vitro* Рисунок 6.2.8) проходит, как минимум, две фазы: быструю и медленную.



Рисунок 6.2.8 – Кинетика снижения интенсивности ЭПР-сигнала (в нормализованных произвольных единицах) от НЧ NiO, собранных на выходном фильтре игаляционной установки, при его инкубации (а) в воде; (б) в супернатанте БАЛЖ; (в) в стерильной бычьей сыворотке крови.

С учетом такой растворимости, при сохранении прежней структуры модели, в которой обусловленная этим процессом элиминация была сведена к потоком из всего двух легочных камер, не считая потока из лимфоузлов, константы скорости этих потоков пришлось бы принять нереалистично высокими без всякого соответствия количественным оценкам солюбилизации *in vitro*. Такое волевое управление моделью вполне могло бы дать желаемый результат, но подорвало бы доверие к ней как к инструменту системного анализа. Поэтому было распределено связанную с растворением элиминацию между большим числом камер модели, учитывая также вероятность внутриклеточной солюбилизации наночастиц (Рисунок 6.2.9).

2. В отличие от всех ранее проводившихся хронических ингаляционных экспериментов как с полидисперсными пылями, так и с наноаэрозолем Fe₂O₃, выход накопления ингалируемого материала на равновесный уровень («плато») в эксперименте с НЧ NiO был не плавно растянутым во времени, а практически завершившимся уже к самому раннему (3-месячному) сроку оценки. При стабильном уровне экспозиции такая кинетика задержки могла быть предположительно объяснена только тем, что в еще более ранние сроки элиминация этих НЧ происходила с существенно более высокими константами скорости, которая в дальнейшем снижалась либо ступенчато, либо постепенно. Первое допущение требовало бы построения двух и ли нескольких отдельных моделей линейной кинетики для разных периодов, а второе – введение в модель некоей математической функции, описывающей постепенно замедляющееся снижение ее констант во времени с относительно быстрым выходом их самих на практически постоянное значение.



Рисунок 6.2.9 – Структура многокамерной модели кинетики легочной задержки, перераспределения и клиренса наночастиц NiO, отложившихся при дыхании в пульмонарной области легких, с учетом их растворимости (добавлены потоки S₂ и S₃).

При этом нет достаточных предпосылок к допущению подобного снижения в ходе хронического ингаляционного воздействия для констант скорости той элиминации частиц, которая обусловлена их растворением. Напротив, вполне предположить ослабление защитно-приспособительных допустимо функциональные механизмов, вызванное продолжающимся токсическим воздействием на организм. И, действительно, фагоцитарная реакция легких на ингаляцию НЧ NiO, весьма выраженная в 3-месячный срок, в последующие сроки была заметно ослаблена (Таблица 6.2.2). Поэтому можно было допустить, что и к 3-месячному сроку она уже была результатом подобного снижения 3a предыдущий период, в начале которого была более интенсивной и эффективной. Таблица 6.2.2 Цитологические показатели _ состояния жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной затравке наночастицами NiO в концентрации 0.23 ± 001 мг/м³. ($\overline{X}\pm S_x$)

•		Длительность периода экспозиции								
	3 м	есяца	6 ме	сяцев	10 месяцев					
Показатели	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO				
Общее число	3,50	21,40	2,94	8,38	3,44	9,63				
клеток	±0,66	±6,01*	±0,53	±0,81*	±0,46	±1,15*				
x10 ⁶										
Альвеолярные	3,06	13,00	2,78	6,67	3,14	5,89				
макрофаги (АМ) x10 ⁶	±0,69	±3,22*	±0,53	±0,66*	±0,39	±0,70*				
Нейтрофильные	0,43	8,40	0,27	1,72	0,30	3,74				
лейкоциты (НЛ) x10 ⁶	±0,18	±3,11*	$\pm 0,08$	±0,26*	$\pm 0,08$	±0,78*				
Отношение	0,26	0,61	0,11	0,26	0,09	0,65				
HJI/AM	±0,18	±0,11	±0,04	±0,04*	±0,02	±0,12*				

Примечание: * — статистически значимое различие с группой «контроль» (при $p \le 0.05$ по t-критерию Стьюдента).

Исходя из всех этих допущений, в математическую модель легочной задержки НЧ NiO взамен идентифицированных для модели задержки НЧ Fe₂O₃ постоянных значений констант скорости перехода из камеры свободных частиц в

камеры, соответствующие пулам частиц, фагоцитированных альвеолярными макрофагами (константа $k_{21} = 0,5$) и нейтрофильными лейкоцитами ($k_{31}=0,15$), были включены функции $0,5+0,5*e^{-.1*t}$ и $0,15+1,35*e^{-.1*t}$.

В результате всех этих преобразований модельный прогноз накопления NiO в легких вполне удовлетворительно отразил экспериментальные результаты в отношении как относительно низкой высоты «плато», так и быстроты его достижения (Рисунок 6.2.10). При этом достигнутый равновесный уровень задержки, прогнозируемый моделью, к концу 10-месячного эксперимента лежит в пределах доверительного интервала среднего значения фактического накопления наночастиц в легких.



Рисунок 6.2.10 – Кинетика накопления NiO в легких крысы, прогнозируемая моделью (Рисунок 6.2.9) для реального периода экспозиции (линия), и средние экспериментальные данные (точки с 95 %-ными ДИ). На оси абсцисс – продолжительность экспозиционного периода в неделях, на оси ординат – содержание NiO в мг на легкие.

Таким образом, многокамерная модель системы, определяющей задержку частиц в легких при хронической ингаляционной экспозиции, которая была первоначально разработана для различных условий воздействия практически нерастворимой полидисперсной минеральной пыли, была успешно использована в этой диссертационной работе как базовая для анализа закономерностей задержки оксидных наночастиц разных химических элементов.

Наиболее существенная адаптация этой модели к условиям воздействия этих наночастиц связана с необходимостью математического описания не только физиологических механизмов их элиминации из легких и внутрилегочной транслокации, но и кинетики растворения *in vivo* при том, что относительный вклад последнего может быть различным для наночастиц разной химической природы.

Повреждение указанных физиологических механизмов особо токсичными наночастицами или же ослабление этих механизмов в результате изменения общей защитной реактивности организма на фоне хронической интоксикации может обусловить нелинейный характер кинетики легочной задержки таких частиц.

В целом, была подтверждена стабильная эффективность рассматриваемой базовой модели, легко адаптируемой к варьирующим условиям хронического ингаляционного воздействия самых различных частиц нанометровых размеров.

6.3. Апробация многокамерной токсикокинетической модели при внутрибрюшинном введении наночастиц

Задачей следующих математических экспериментов было проверить основные гипотезы, положенных в основу разработки структуры камерной модели кинетики распределения и задержки в организме металлосодержащих наночачстиц отложившихся в глубоких дыхательных путях представленной на Рисунке 6.3.1 путем апостериорной идентификации модели по данным проведенных исследований при параллельном внутрибрюшинном введении НЧ магнетита разных размеров и НЧ серебра и золота (результаты которых описаны в Главе 4). В данном случае чтобы получить надежные экспериментальные данные использовалось внутрибрюшинное введение исходя из того, что НЧ как из легких, так и из забрюшинного пространства попадают в кровь, образуя так называемый центральный токсикокинетический пул. Далее учитывается то, что частицы не только могут быть захваченными фиксированными макрофагами особенно печени и селезенки, но и растворяться как в крови самой, так и в органах. Поэтому предусмотрено две взаимосвязанные кинетики: кинетика частиц и кинетика ионов, в которые переходят частицы в результате растворения. Исходя из этого, базовая концептуальная модель приняла вид, отраженный на Рисунке 6.3.2.

Предполагалось проверить:

1. Влияние дисперсности нановещества на накопление его в органах и тканях.

2. Влияние растворимости нановещества в биосредах на его кинетику.

Камерная модель, отражающая кинетику НЧ Fe₃O₄ представлена на Рисунке 6.3.3.



Рисунок 6.3.1 – Структура многокамерной модели кинетики распределения и задержки в организме металлсодержащих наночачстиц отложившихся в глубоких дыхательных путях

241



Рисунок 6.3.2 – Многокамерная модель кинетики металлсодержащего нановещества при внутрибрюшинном введении



Рисунок 6.3.3 – Структура многокамерной модели кинетики наночастиц магнетита при внутрибрюшинном введении

Частицы

Коэффициенты модели отражены в Таблице 6.3.1. В Таблице 6.3.2, в которой сопоставлены экспериментальные данные (подробно описанные в Главе 5), и результаты, которые дает математическая модель. Кинетическая константа перехода частиц Fe_3O_4 в ионы Fe в различных органах и биосредах представлена в Таблице 6.3.3.

Таблица 6.3.1 – Коэффициенты модели кинетики наночастиц магнетита при внутрибрюшинном введении

10 нм											
k ₃₁	\mathbf{k}_{m1}	r_1	k_{32}	k_{a2}	k _{nz}	r _z	$T_{\mathbf{R}}$	T ₅	T ₆	m ₂₁	m_{col}
0,64 4	9	0,3	0,018 2	0,15	0,07	0,3	0,53	0,19	0,3	0,4	3

m.13	m ₃₂	m_4	2	$m_{\rm S}$	2	m	62	m ₇₂	n	124	n	125	m_{26}	$m_{\cos 5}$	k ₂₃	
0,5	0,0078	0,01	55	0,5)	0,0	003	0,25 3		1	0,	,05	0,05	0,54	0,5	
	частицы									Ионь	I					
пастицы								110112								
	X1	X2	2	X3	X	4	X6	Y	1	Y2	,	Ŋ	73	Y4	Y5	Y6
нед	ЖКТ	Кро вь	Γ	Іеч	Ce	ел	Пр.	Жŀ	СТ	Кро	ВЬ	П	еч.	Сел	Почки	Пр
	Экспері	имент	22	,825	7,0	07		Экспе	риме	ент		18	,26	1,262		
6	35.77	19.2 17	22	.625	7.0 4)9 I	2.76 5	5.8	22	17.8 5	80	18.	.351	1.271	10.357	1.942
					1			50 н	Μ	L			I.		1	
k ₃₁	k _{on1}	r_1		k _a ,	ι	k,	42	$k_{\alpha z}$	1	2		r _a	T _a	T _B	m ₂₁	$m_{\infty 1}$
0, 6 4 4	9	0,3	3	0,01	8	0	,1	0,07	(),3	0,	225	0,05	0,3	0,3	3

m. ₁₂	m.,,,	m_{4i}	2 11	52	m ₆₇	e	m ₇₃	n	1.24	m_{23}	m_{26}	m_{ce5}	k_{23}	
0,2	0,085	0,0	6 0	,5	0,00	3	0,75	0	,12	0,05	0,05	0,54	0,5	
	частицы						Ионы							
нед	X1	X2	X3	X	4 2	X6	Y	1	Y2		Y3	Y4	Y5	Y6
	ЖКТ	Кро вь	Печ	Ce	ел Г	Тр.	ЖК	Т	Кров	ъГ	Іеч.	Сел	Почки	Пр

	Экспер	имент	32,69	8,4	r.)	Экспериме	НТ	10,274	3,4125		
6	35.77	19.2 17	32.674	8.5	2.76 5	5.822	17.80 5	10.234	3.441	10.357	1.942

Таблица 6.3.2 – Сравнение модельных данных и результатов экспериментов по накоплению наночастиц Fe₃O₄в некоторых органах

	10	НМ		50 нм				
	V = 355,	7 мг/нед.		№ = 364,1 мг/нед				
Co	держание	в органах, м	Г	Содержание в органах, мг				
Селезе	енка	Пече	НЬ	Селезе	енка	Пече	НЬ	
Частицы	Ионы	Частицы	Ионы	Частицы	Ионы	Частицы	Ионы	
	Экспер	римент		Эксперимент				
7,07	1,2625	22,825	18,26	8,612	3,471	33,5	10,499	
	Вычис	сления			Вычи	сления		
7,159	1,852	22,069	18,674	8,365	3,505	33,494	11,078	

Таблица 6.3.3 – Кинетическая константа перехода частиц Fe₃O₄ в ионы Fe в различных органах и биосредах

Органы	Кровь	Селезенка	Печень	ЖКТ	Почки	Другие органы
10 нм, нед ⁻¹	0,5	1,9	2	1,5	1,5	1,5
50 нм, нед ⁻¹	0,5	1,25	1,1	1,5	1,5	1,5

Как видно из Таблиц, мелкие наночастицы (10 нм) меньше накапливаются как в селезенке, так и в печени, чем более крупные (50 нм). В то же время, растворимость мелких частиц оказывается в 1,5-2 раза выше, чем более крупных. Следует также подчеркнуть весьма хорошее совпадение расчетных и экспериментальных данных.

Хорошее совпадение экспериментальных результатов и математических данных было найдено и в следующем эксперименте.

Камерная модель, отражающая кинетику НЧ Ад и НЧ Аи представлена на

Рисунке 6.3.4.

В Таблице 6.3.4 представлены экспериментальные данные (подробно описанные в Главе 5) и результаты которые дает математическая модель. Кинетическая константа перехода НЧ Ag и HЧ Au в соответствующие ионы в различных органах и биосредах представлена в Таблице 6.3.5.

Таблица 6.3.4 – Сравнение модельных данных и результатов экспериментальных по некоторым органам

	НЧ Аи		НЧ Ад					
V =	7,8 мг/не	Д	V = 7,8 мг/нед					
Содержани	е в органа	ах, мг	Содержание в органах, мг					
Селезенка	Печень	Почки	Селезенка Печень Почки					
Эк	сперимен	Г	Эксперимент					
0,2112	0,6643	0,00504	0,1672	0,3963	0,16254			
Вы	гчисления	I	Вычисления					
0,23	0,665	0,00511	0,174	0,402	0,176			

Таблица 6.3.5 – Кинетические константы перехода частиц золота и серебра в ионы в различных органах и биосредах

Органы	Кровь	Селезенка	Печень	ЖКТ	Почки	Другие органы
Нанозолото, нед-1	0,5	1,9	2	1,5	1,5	1,5
Наносеребро, нед-1	1	1,5	4	1,5	2,5	1,5

Как видно из Таблиц, содержание в селезенке, печени и почках НЧ Au и HЧ Ag, вычисленные с помощью модели (Рисунок 6.3.4) очень близки к наблюдаемым в эксперименте. Сравнение растворимостей НЧ Au и HЧ Ag в биосредах, подобранных с помощью модели, указывает, на то, что причиной большего удержания нанозолота в органах является его меньшая по сравнению с наносеребром растворимость в биосредах.

Частицы



Рисунок 6.3.4 – Структура многокамерной модели кинетики наночастиц серебра и золота при внутрибрюшинном введении.

Резюме

Результаты многокмерного моделирования свидетельствуют о том, что токсикокинетика (задержка, перераспределение и элиминация) металлооксидных наночастиц контролируются как физиологическими, так и физико-химическими высокой способностью механизмами, а именно ИХ К диффузионному мембраны, проникновению через наряду С активным ЭНДОЦИТОЗОМ, осуществляемым различными клетками, и постепенным растворением *in vivo*.

Логично предположить, что относительный вклад перечисленных механизмов в эти токсикокинетические процессы для разных НЧ неодинаков в зависимости от их размера и химического состава, но для изученных НЧ Fe₂O₃ и NiO роль растворения в биологической среде преобладает.

В математических экспериментах путем апостериорной идентификации модели были подтверждено влияние как дисперсности нановещества на накопление его в органах, так и растворимости нановещества в биожидкостях на его кинетику, по данным проведенных исследований при параллельном внутрибрюшинном введении НЧ магнетита разных размеров и НЧ серебра и золота.

Таким образом, особо высокая цитотоксичность НЧ объясняется с одной стороны характеристикой, связанной с наноразмерностью частиц любого химического состава как таковой (способность к пенетрации через биологические барьеры, перенос с лимфой и кровью в отдаленные органы, проникновение внутрь клеток и клеточных органелл, огромная удельная поверхность, особый характер протекающих на ней физических взаимодействий и химических процессов), а с другой способностью их к солюбилизации *in vivo* с выделением токсичных ионов вблизи ультраструктурных и молекулярных мишеней их воздействия.

Как физиологический, так и физико-химический механизмы самоочищения легких от НЧ, ослабляя токсическое повреждение ими этого органа, вместе с тем создают предпосылки к системной токсичности соответствующего металла, попадающего в различные органы либо в сохранившемся состоянии наноразмерной частицы, либо после ее растворения – в ионно-молекулярной, хелатной или белковосвязанной форме.

Поэтому, оценку цитоксического действия НЧ именно на легочные фагоциты целесообразно использовать в качестве скринингового метода для сравнительной оценки *in vivo* токсичности этих НЧ в более общем значении этого термина. В связи с тем, что НЧ которые более цитотоксичны для альвеолярных макрофагов, предположительно более цитотоксичны и для любых других клеток, внутрь которых они попадают.

ГЛАВА 7. АПРОБАЦИЯ СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА К ТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ НЕКОТОРЫХ НАНОЧАСТИЦ

Против вредного действия металлических наночастиц были теоретически разработаны и эксперименально апробированы комплексы биопротекторов повышающих резистентность организма к вредному действию наночастиц серебра (НЧ Аg), оксида меди (НЧ СuO) и оксида никеля (НЧ NiO).

Исходя из имеющихся представлений о характеристики токсического и генотоксического действия этих металлов (см. Главы 1, 3, 4), а также собственного большого опыта эффективного применения биопрофилактических средств при различных хронических и субхронических экспериментальных интоксикациях (в том числе, связанных с повреждением ДНК), были выбраны следующие составы испытуемых БПК:

ослабляющий токсическое действие наночастиц серебра: - глутаминовая кислота 40 мг (нейтрализованная бикарбонатом натрия и даваемая в питье взамен воды в виде 1,5 % раствора); глицин 12 мг; ацетилцистеин (АЦЦ) 9,3 мг; перепарат рыбьего жира 1 мл; пектин яблочный 0,2 г; «Компливит селен» 4 мкг; «Компливит Са» 160 мг на крысу;

ослабляющий генотоксическое действие наночастиц меди: глутаминовая кислота 40 мг (нейтрализованная бикарбонатом натрия и даваемая в питье взамен воды в виде 1,5 % раствора); глицин 12 мг; ацетилцистеин (АЦЦ) 9,3 мг; перепарат рыбьего жира 1 мл; пектин яблочный 0,2 г; поливитаминный-полиминеральный препарат «Алфавит» за исключением таблетки, содержащей медь (витамин B12 0,15мкг; Fe 0,6мг; Se 5,8мкг; Mo 3,75 мкг; I 12,5мкг; Zn 1,25мг;

Mn 16,7мкг; витамин Е 0,84мг; витамин С 4,4мг; витамин А 4,2 мкг);

ослабляющий генотоксическое и цитотоксическое действие наночастиц никеля: глутаминовая кислота 40 мг (нейтрализованная бикарбонатом натрия и даваемая в питье взамен воды в виде 1,5 % раствора); глицин 12 мг; ацетилцистеин (АЦЦ) 9,3 мг; перепарат рыбьего жира 1 мл; пектин яблочный 0,2 г; «Триовит» 0,38 мкг на крысу; «Аскорутин» 1,5 мг, «Калия йодид» 1 мкг.

Дозировки указаны на 1 крысу. Раствор глютамината давали с питьем, перепарат рыбьего жира вводили внутрижелудочно, отстальные препараты добавляли в корм.

Как видно из Таблицы 7.1.1 по тем показателям состояния организма, сдвиг которых по сравнению с контролем при действии НЧ Ад статистически значим, его ослабление при действии того же НЧ Ад на фоне БПК явно имеет место. Так, число эритроцитов, которое в группе НЧ Ад заметно снижено, при действии того же НЧ Ад на фоне БПК не отличается от контрольного. Немаловажно, что при этом нормализуются также содержание гемоглобина (которое без БПК было статистически не значимо, но явно снижено) и процент ретикулоцитов (только в группе НЧ Ад повышенный по сравнению с контролем, хотя и статистически недостаточно значимо). Нормализуется также содержание МДА. Статистически значимо снижается (в сравнении с группой, получавшей НЧ Ад без БПК) концентрация дельта-аминолевулиновой кислоты моче. однако В токсикологическая существенность этого сдвига мало вероятна, поскольку само по себе действие НЧ Ад не вызвало повышения данного показателя, а сам по себе БПК – его снижения.

При действии одних НЧ Ag активность СДГ в лимфоцитах крови значимо снижен по сравнению с контрольным значением, в то время как при действии того же НЧ Ag на фоне БПК или только БПК он даже слегка повышен.

Важно подчеркнуть, что ни по одному показателю не выявлено статистически значимых различий между группами, получавшими только БПК, и

контрольной. Таким образом, безусловное требование безвредности любого биопротекторного комплекса, разрабатываемого с перспективой профилактического применения, судя по результатам данного эксперимента, соблюдено.

Таблица 7.1.1 – Показатели состояния организма крыс, подвергшихся субхронической затравке частицами наносеребра без защиты и на фоне приема БПК, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Показатели	Группы крыс, получавшие:									
	Воду	НЧ Ад	НЧ Ад	БПК						
	(контроль)		+ БПК							
Масса тела исходная, г	196,25±2,62	197,1±2,25	197,1±2,41	196,7±2,34						
Масса тела после затравки,	234,5±5,38	232,08±4,71	233,50±4,90	235,50±3,94						
Г										
СПП,сек.	13,5±1,04	15,28±1,27	15,45±0,96	12,85±1,02						
Норковый рефлекс, кол-во	6,0±0,89	7,33±1,11	7,58±1,09	6,08±1,21						
загляд. за 3 мин										
Гемоглобин в крови, г/л	147,9±4,0	139,9±3,6	143,0±4,0	141,9±2,8						
Эритроциты, 10 ¹² г/л	4,34±0,04	3,87±0,13*•	4,25±0,04	4,04±0,09						
Цвет.показатель	1,73±0,06	1,86±0,089	1,71±0,04	1,78±0,04						
Ретикулоциты, ‰	27,17±5,45	31,67±3,25	27,25±2,67	29,67±3,84						
Лимфоциты, %	46,8±2,94	50,9±2,42	47,5±3,15	48,5±3,85						
Сегментоядерные	38,9±2,99	32,75±2,42	34,4±3,01	33,7±3,3						
нкйтрофилы,%										
Палочкоядерные	2,5±0,28	2,84±0,53	2,67±0,48	3,2±0,44						
нейтрофилы, %										
Моноциты, %	5,6±0,77	7,5±0,64	8,25±1,15	6,3±0,8						
Эозинофилы, %	6,3±0,7	5,8±0,9	7,3±1,3	7,7±1,6						
Базофилы, %	0,73±0,23	0,5±0,15	0,75±0,25	0,6±0,27						
Общий белок в сыворотке	74,0±1,6	75,4±2,5	73,7±1,95	79,96±2,85						
крови, г/л										
Альбумины в сыворотке	43,1±1,68	41,44±1,04	42,95±0,9	45,92±0,9						
крови, г/л										
Глобулины сыворотке	31,6±1,80	33,92±2,49	30,82±1,81	34,1±2,26						
крови, г/л										
Показатели	Группы крыс, получавшие:									
--------------------------	--------------------------	--------------	-------------	--------------	--					
	Воду	НЧ Ад	НЧ Ад	БПК						
	(контроль)		+ БПК							
А/Г индекс	1,39±0,10	1,28±0,08	1,46±0,12	1,39±0,09						
Активность СДГ, число	805,33±12,6	679,9±12,4*●	827,8±22,1	834,1±11,2						
гранул в 50 лимфоцитах										
Активность АлТ в	0,19±0,02	0,20±0,025	0,21±0,02	0,16±0,026						
сыворотке крови,										
ммоль/ч*л										
Активность АсТ в	0,25±0,016	0,3±0,02	0,25±0,02	0,26±0,02						
сыворотке крови,										
ммоль/ч*л										
Коэфф. де Ритиса	1,41±0,19	1,73±0,26	1,47±0,24	2,31±0,62						
Каталаза в сыворотке	1,14±0,23	1,22±0,19	1,23±0,22	1,43±0,20						
крови, мкмоль/л										
МДА в сыворотке крови	5,84±0,22	6,23±0,14	5,72±0,25	5,78±0,21						
нмоль/л										
Билирубин в сыворотке	1,58±0,09	1,52±0,12	1,52±0,08	1,47±0,11						
крови, мкмоль/л										
ү-глутамилтрансфераза,	3,25±0,8	2,72±0,65	2,52±0,37	2,57±0,8						
Ед/л										
Щелочная фосфатаза в	92,54±13,4	119,6±17,4	131,5±11,9*	108,9±18,4						
сыворотке крови, Ед/л										
Креатинин в сыворотке	33,2±1,2	35,54±1,5	33,5±1,4	35,7±1,52						
крови, мкмоль/л										
Суточный объем мочи, мл	49,8±5,01	44,4±5,63	52,3±5,4	41,6±4,76						
Кислотность мочи,	7,88±0,3	7,25±0,2	7,38±0,2	7,58±0,3						
единицы рН										
Удельный вес мочи	1,015±0	1,014±0,0006	1,015±0	1,014±0,0007						
Креатинин в моче, моль/л	0,7±0,05	0,84±0,09	0,725±0,056	0,76±0,05						
Копропорфирин в моче,	44,0±7,4	54,4±7,73	40,0±5,5	40,8±8,36						
нмоль/л										
δ-АЛК мочи, мкмоль/л	7,6±0,58	7,2±0,49•	5,7±0,45	7,7±0,45						
оксипролин в моче,	0,90±0,2	0,74±0,11	0,70±0,2	1,03±0,4						

Показатели	Группы крыс, получавшие:						
	Воду НЧ Ад НЧ Ад БПК						
	(контроль)		+ БПК				
мкМоль/сут							
Масса печени, г	3,31±0,11	3,35±0,09	3,58±0,04	3,36±0,1			
Масса почек, г	0,66±0,013	0,63±0,015	0,061±0,017*	0,66±0,023			
Масса селезенки, г	0,41±0,02	0,44±0,04	0,44±0,03	0,39±0,03			

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «НЧ Ag+БПК»; (при $p\leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 7.1.2 – Содержание серебра в печени, селезенке и почках (мг/г) у крыс после повторных внутрибрюшинных введений соответствующего нанометалла, $(\overline{X_{cp}} \pm S_x)$

Группа крыс,	Ткани				
получавшие	Печень Селезенка Почка				
Воду (контроль)	0,0017±0,0003	$0,02{\pm}0,007^+$	0,002±0,0007		
НЧ Ад	0,12±0,01*	0,40±0,04*+	$0,26{\pm}0,09^*$		
НЧ Ад + БПК	0,11±0,01*	0,43±0,04*+	$0,23\pm0,05^{*+}$		

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; $^{\circ}$ – с группой «HY Ag»; $^{+}$ – от содержания данного металла в печени (при <u>p</u> \leq 0,05 по *t*-критерию Стьюдента).

Вероятно, позитивные эффекты испытанного БПК связаны с влиянием не на токсикокинетику (распределение, выведение, задержку) наносеребра в организме, а на те или иные токсикодинамические механизмы, поскольку, как видно из Таблицы 7.1.2, на содержание серебра в органах (кроме почек) прием БПК значимо не повлиял.

Позитивный эффект использованного комплекса биопротекторов был отмечен при гистологическом изучении. Из данных Таблицы 7.1.3 видно, что по сравнению с группой «НЧ Ag» в группе «НЧ Ag + БПК» статистически значимо снижены число клеток Купфера, их нагруженность частицам и число безъядерных гепатоцитов (оказавшееся даже значимо меньшим, чем в контроле), а репаративный показатель числа двуядерных гепатоцитов, наоборот, в 1,5 раза значимо повышен.

Как видно из той же Таблицы, в селезенке действием БПК было предупреждено вызванное НЧ Аg снижение отношения белой пульпы к красной, которое в этой группе не отличалось от контрольного показателя.

В почках при действии НЧ Аg на фоне приема БПК отсутствует описанное в Главе 4 «серебрение» гломерулярных базальных мембран. Едва ли действие биопротекторов могло ослабить то образование Ag-ионов, которым мы предложили в Главе 4 объяснить этот феномен. Возможно однако, что действие БПК вызвало сдвиг pH или какие-то другие физико-химические изменения в почечной ткани, препятствующие обратному превращению Ag-ионов в «ядра» элементного серебра, которое, очевидно и отлагается на мембранах. Во всяком случае, такое превращение является, очевидно, ключевым механизмом гистохимического метода серебрения (Gallyas F., 1980).

Таблица 7.1.3 – Некоторые морфометрические показатели клеточной структуры печени и селезенки крыс, (X_{cp} ± S_x)

Показатели	Группы крыс, получавшие			
	Воду	НЧ Ад	НЧ Ад + БПК	
	(контроль)			
Число безъядерных	17,6±0,6	18,5±1,3	13,0±1,0*•	
гепатоцитов				
Число двуядерных	5,9±0,8	7,8±0,6	12,0±1,5*•	
гепатоцитов				
Число клеток Купфера	16,5±0,5	25,0±0,8*	20,0±0,6*•	
Средневзвешенный балл	0	0,91±0,7	0,51±0,09•	
нагруженности клеток				
Купфера частицами ⁶				
Отношение белой к красной	0,59±0,036	0,37±0,035*	0,59±0,086•	
пульпе селезенки ⁷				

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «НЧ Ag»; (при <u>p</u> \leq 0,05 по t-критерию Стьюдента).

⁶ Визуальная оценка нагруженности клетки частицами выражается в баллах от 0 до 4. Средневзвешенный показатель рассчитывается с учетом процентного соотношения между клетками, оцененными разными баллами (общее число оцененных клеток - 100).

⁷ Результаты планиметрии с помощью сетки Автандилова

Как видно из Таблиц 7.1.3, 7.1.4 происходит уменьшение среднего значения Кфр ядерной ДНК в оцененных тканях у крыс, подвергавшихся внутрибрюшинному введению наночастиц серебра или меди на фоне приема биопротекторов, по сравнению с крысами, получавшими только НЧ, причем в печени, костном мозге, селезенке и почке это различие статистически значимо.

Таблица 7.1.4 – Коэффициент фрагментации (Кфр) геномной ДНК крыс, подвергшихся субхронической затравке частицами наносеребра без защиты и на фоне приема БПК (по результатам ПДАФ-теста), ($\overline{X} \pm S_x$)

Группы крыс,		Ткани			
получавшие					
	Печень	Костный мозг	Селезенка	Почка	
Воду (контроль)	0,399	0,3	0,379	0,385	
	±0,001	±0,003	±0,002	±0,003	
НЧ Ад	0,461	0,455	0,462	0,42	
	±0,002*	$\pm 0,032^{*}$	$\pm 0,001^{*}$	$\pm 0,008^{*}$	
НЧ Ад + БПК	0,408	0,373	0,419	0,407	
	±0,011•	±0,003*•	±0,003*•	±0,006 ^{*•}	

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; • - с группой «НЧ Ag»; (при $p \leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 7.1.5 – Влияние БПК и/или медьсодержащих частиц на коэффициент фрагментации геномной ДНК (ПДАФ-тест) в клетках различных органов, ($\overline{X_{cp}} \pm S_x$)

	Группы крыс, получавшие			
Органы	НЧ СиО	+БПК	БПК	воду
	0,426±	0,404±	0,394±	0,396±
Печень	0,0020*	0,002*	0,0040	0,0020
	$0,460\pm$	0,418±	0,377±	0,369±
Селезенка	0,0020*	0,0015*□■	0,0028*	0,0016

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; с группой «НЧ СиО»; $^{\circ}$ – с группой «БПК» (при <u>p</u> \leq 0,05 по t-критерию Стьюдента). Также прием БПК снизил (почти до полной нормализации) Кфр и при хроническом ингаляционном воздействии НЧ NiO (Таблица 7.1.6).

Таблица 7.1.6 – Коэффициенты фрагментации геномной ДНК крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной экспозиции к наночастицам оксида никеля и/или биопрофилактического комплекса, ($\overline{X_{cp}} \pm S_x$)

Ялросолержащие		Время ингаля	ционной экспозици	И	
клетки		3 мес			
периферической	Контроль	НЧ NiO	НЧ NiO + БПК	БПК	
крови	0,4229 <u>+</u>	0,4480 <u>+</u>	0,4264 <u>+</u>	0,4219 <u>+</u>	
	0,0008	0,0017*	0,0008*•	0,0003	

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; – с группой «НЧ NiO» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

В другом эксперименте, предварительный прием биопрофилактического комплекса перед интратрахеальным введением НЧ NiO сниизл их цитотоксическое действие. Из Таблицы 7.1.7 видно, что интратрахеальное введение НЧ NiO вызывает статистически значимое увеличение количества клеток БАЛЖ, нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), а так же отношения НЛ/АМ.

Между тем, все перечисленные цитологические характеристики БАЛЖ у крыс, которые в течение месяца перед инстялляцией НЧ NiO получали БПК, были, хотя и тоже повышены, но в заметно меньшей степени, чем без такой премедикации.

Таблица 7.1.7 – Число клеток бронхоальвеолярного лаважа через 24 часа после интратрахеального введения крысам наночастиц оксида никеля 0,2 мг /мл, $(X_{cp}^-\pm S_x)$

		Отношение		
Вводимые вещества	общее	AM	НЛ	НЛ/АМ
Дист.вода (контроль)	2,59±0,68	1,58±0,53	0,88±0,29	0,92±0,36
NiO	7,49±1,69*	2,08±0,44	5,22±1,34*	2,81±0,91*
NiO+БПК	4,65±1,96	1,79±0,54	2,88 ±0,82*	2,32 ±0,55*
БПК контроль	2,39±0,50	1,42±0,29	0,95±0,29	0,71±0,19

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль» (при *p*≤0,05 по *t*-критерию Стьюдента).

Таблица 7.1.8 – Некоторые биохимические показатели бронхоальвеолярного лаважа через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксида никеля $0.2 \text{ мг/мл.} (X_{cn} \pm S_x)$

Показатели	Контроль	NiO	NiO + БПК	БПК контроль
ЩФ в НОЖ, Е/л	23,3±6,4	33,5±3,4	21,8±3,7	35,0 ± 2,8
АЛТ в НОЖ, Е/л	1,46±0,20	2,27±0,71	1,40±0,22	0,94±0,21
АСТ в НОЖ, Е/л	6,08±	16,33±	7,58±	6,18±
	1,97	3,5*	1,44•	0,60
Амилаза в НОЖ, Е/л	10,1±3,3	25,4±	10,0±	13,4±4,9
		9,1	2,4	
ГГТП в НОЖ, Е/л	1,25±	4,21±	3,65±	1,48±
	0,41	0,97*	0,71*	0,30
ЛДГ в НОЖ, Е/л	21,0±	190,9±38,0*	81,1±	31,5±
	4,7		24,4*•	3,1

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль; «•» - с группой «NiO» (при $p \le 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Как видно из Таблицы 7.1.8, при интратрахеальном введении НЧ NiO происходит статистически значимое увеличение уровня АСТ, ЛДГ и ГГТП в надосадочной жидкости БАЛ, что свидетельствует о цитотоксическом действии НЧ NiO. У группы крыс, которая перед введением НЧ NiO предварительно принимала БПК, уровень АСТ не отличается от контрольного, а уровень ЛДГ статистически значимо ниже, чем у группы крыс БПК не принимавших, что говорит о цитопротекторном эффекте БПК.

Резюме

В экспериментальных исследованиях показано, что на фоне приема комбинаций некоторых биологически активных веществ, подобранных исходя из теоретических предпосылок, механизмов токсического действия металлических и/или металлооксидных наночастиц и накопленного опыта интегральные и специфические проявления токсичности наночастиц могут быть заметно ослаблены.

На фоне перорального приема комбинации биопротекторов (пектин, поливитаминно-полиминеральный препарат, глютаминат натрия, глицин, ацетилцистеин и препарат рыбьего жира с высоким содержанием НЭЖК группы омега-3), были существенно ослаблены цитотоксичность, субхроническая токсичность и/или генотоксичность наночастиц серебра, оксида меди и оксида никеля. Происходило снижение накопления наночастиц во внутренних органах (в том числе статистически значимо в селезенке) и торможение развития патологических в них изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В большом числе экспериментов, подробно описанных в Главах 3 и 5, обнаружено, что легочная фагоцитарная реакция на отложение металлических или металлооксидных НЧ является весьма выраженной, так что при равной дозе и той же химической идентичности увеличение клеточности БАЛЖ в ответ на отложение НЧ гораздо выше, чем на отложение МЧ, при значительно более высокой нагрузке единичной фагоцитирующей клетки частицами. К тому же, этот сдвиг и, в особенности, увеличение числа нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) с увеличением численного отношения НЛ/АМ тем более выражены, чем мельче частицы в пределах нанометрового диапазона.

Особо следует подчеркнуть, что, как это наблюдалось ранее, и при хронической ингаляционной экспозиции к полидисперсным пылям кварцита в концентрациях, измеряемых десятками мг/м³ (Privalova L.I. et al., 1987), хроническая ингаляция наноаэрозоля Fe_2O_3 со средней концентрацией ≈ 1 мг/м³ или NiO со средней концентрацией $\approx 0,2$ мг/м³ вызвала аналогичные по знаку и сопоставимые по выраженности сдвиги клеточного состава БАЛЖ. В целом, принципиальная схожесть реакции на ингалируемые и интратрахеально введенные частицы (в данном случае, НЧ) подтверждает адекватность интратрахеальной модели.

Давно известно, что усиление мобилизации НЛ является важным механизмом частичной компенсации повреждения, нанесенного цитотоксичными микрочастицами основному, а именно – макрофагальному механизму их легочного клиренса. Экспериментальные результаты, изложенные в диссертационной работе, подтвердили, что сказанное еще более справедливо для частиц нанодиапазона, и что усиленный приток НЛ, будь это элемент воспаления или нормальная защитная реакции, играет важнейшую роль в самоочищении

легких от НЧ. Оба эффектора фагоцитарного механизма этого самоочищения, то есть АМ и НЛ, могут быть нагружены наночастицами в значительно большей степени, чем соответствующими МЧ, как было показано в параллельно проведенном сравнительном эксперименте с частицами магентита 10 нм, 50 нм и 1 мкм. При этом, чем мельче действующие НЧ, тем более жадно они поглощаются клетками обоих типов.

При заданном же диаметре наночастиц сравнительная интенсивность фагоцитарной реакции легких на их отложение и активность поглощения частиц фагоцитами предопределяются их химической природой, что было показано, например, при сопоставлении реакций на НЧ серебра и золота или на НЧ оксидов никеля и железа.

От химической природы НЧ зависят и особенности их внутриклеточного распределения. Так, например, при просвечивающей электронной микроскопии АМ из БАЛЖ после введения НЧ серебра или НЧ золота оказалось, что первые имеют большее сродство к митохондриям, но меньшую способность к пенетрации внутрь ядра, чем вторые.

Во всех экспериментах полуконтактная атомно-силовая микроскопия (пкАСМ) выявила многочисленные «вдавления» на поверхности как АМ, так и НЛ. Чем мельче вводившиеся интратрахеально частицы, тем меньше средний диаметр этих вдавлений и тем выше их среднее число на единицу поверхности клетки. Ряд косвенных, но, в совокупности, убедительных аргументов позволяет утверждать, что такая ямка является не просто «пробоиной» от пассивного диффузионного прохождения частицы через клеточную мембрану (возможность которого признается многими авторами и не может быть в принципе отвергнута), а зафиксированным на определенный момент времени следом ее инвагинации в процессе активного эндоцитоза (фагоцитоза) частицы. Важно подчеркнуть, что образования вышеописанный феномен «вдавлений» поверхности на альвеолярного макрофага не является артефактом, связанным с интратрахеальным введением относительно высоких доз наночастиц, поскольку он обнаруживается и при ингаляционной экспозиции к низкой концентрации НЧ оксида железа.

Просвечивающая электронная микроскопия тоже выявляет инвагинацию клеточной мембраны с отделением эндосомы (фагосомы), что также свидетельствует об активном эндоцитозе этих НЧ как, по меньшей мере, одном из механизмов их проникновения внутрь клетки, хотя нет оснований отрицать возможность и пассивной пенетрации (диффузии) наночастиц через клеточную мембрану любой клетки. Была показана положительная ранговая корреляция между показателями НЛ/АМ и фагоцитарной активностью клеток, измеренной числом «вдавлений».

Таким образом, в серии взаимно подтверждающих экспериментов с воздействием интратрахеальным введением И ингаляционным разных металлсодержащих НЧ было показано, что как мобилизация фагоцитирующих клеток (АМ, но в особенности, НЛ) на свободную поверхность глубоких дыхательных путей, так и фагоцитарная активность единичной клетки при отложении НЧ значительно выше, чем при отложении даже мельчайших МЧ того же химического состава, причем оба процесса тем более интенсивны, чем меньше диаметр НЧ, но зависят также от химической природы нановещества. К этому следует добавить, что, как показано уже в первых наших экспериментах с наномагнетитом, легочная ткань освобождается от интратрахеально введенных наночастиц тем быстрее, чем они мельче. Причиной этого, по-видимому, является как более активный фагоцитарный механизм ее самоочищения, так и большая растворимость НЧ, меньших по размеру и потому имеющих более высокую удельную поверхность. Участие обоих механизмов самоочищения легких от НЧ было явным и в экспериментах с хронической ингаляцией НЧ Fe₂O₃ и NiO, что подтверждалось путем математического моделирования, обсуждаемого далее.

Как было показано, многие металлсодержащие НЧ (в частности, серебра и оксидов меди или никеля), даже будучи высокостабильными в деионизированной водной суспензии, ускоренно растворяются при добавлении к ней NaCl или модельной биологической среды (например, бесклеточной фракции БАЛЖ или стерильной сыворотки эмбриональной бычьей крови). Тот же эффект солюбилизации в биосредах (особенно в сыворотке) НЧ, нерастворимых или

малорастворимых в деионизированной воде, наблюдался при изучении кинетики потери НЧ Fe₂O₃ или NiO с поверхности поликарбонатного фильтра, на котором они были задержаны при протягивании воздуха из ингаляционной установки.

Как физиологический, так и физико-химический механизмы самоочищения легких от НЧ, ослабляя токсическое повреждение ими этого органа, вместе с тем создают предпосылки к системной токсичности соответствующего металла, попадающего В различные органы либо сохранившемся В состоянии наноразмерной частицы, либо после ее растворения – в ионно-молекулярной, хелатной или белковосвязанной форме (которые пока приходится рассматривать суммарно, условно обозначая их как «ионы»). Поэтому вопрос о том, какой из этих токсикокинетических процессов наиболее важен, имеет существенное значение, но изучен он недостаточно полно.

Ранее серией экспериментальных исследований и связанным с ними многокамерным математическим моделированием (Katsnelson B.A., Privalova L.I., 1984; Привалова Л.И., 1990; Katsnelson B.A. et al., 1992, 1994, 1997) было обосновано представление о том, что судьба практически нерастворимых микрометровых частиц (МЧ), отложившихся в глубоких дыхательных путях при хронической ингаляционной экспозиции, контролируется физиологическими макрофагального нейтрофильного фагоцитоза, механизмами И a также мукоцилиарного транспорта и поэтому зависит от размера и цитотоксичности Было частиц. показано, ЧТО ИХ длительная задержка В легких И трахеобронхиальных лимфоузлах может быть удовлетворительно предсказана при математическом моделировании этих механизмов даже без учета различий растворимости таких МЧ.

Далее, используя набор параметров этой модели (констант скорости переноса) для построения модели кинетики легочной задержки, перераспределения и клиренса НЧ Fe₂O₃, направление и пределы изменения этих параметров задавались как теоретическими и априорными соображениями, так и результатами сравнительной оценки клеточной популяции БАЛЖ при ингаляции наночастиц, при их интратрахеальном введении и при интратрахеальном

введении кварца DQ_{12} , однако оказалось невозможным даже отдаленно имитировать фактические данные о задержке Fe_2O_3 в легких и лимфоузлах, которые были намного ниже прогнозируемых моделью.

Удовлетворительно приблизиться к ним удалось, только введя в модель потоки элиминации, связанные с растворением и отчасти с прямой пенетрацией наночастиц в кровь и лимфу. Значения соответствующих констант скорости растворения наночастиц *in vivo* ориентировались на значения, полученные при растворении их в вышеназванных модельных средах *in vitro*.

Таким образом, только в том случае, когда в модель были включены близкие к реальным константы скорости растворения наночастиц, она прогнозировала характерную для токсикокинетики 1-го порядка кривую накопления вещества в органе с постепенным выходом на равновесный уровень («плато»).

Переходя к аналогичному моделированию для условий хронической ингаляционной экспозиции крыс к НЧ NiO, было естественным принять за отправную точку именно вариант модели, обоснованный для НЧ Fe₂O₃, и принять некоторые ее параметры, опираясь на аналогичные сравнительные оценки клеточности БАЛЖ и солюбилизации НЧ, адаптируя их с учетом физикохимических и биологических особенностей НЧ NiO. Так, была распределена связанная с растворением элиминация между большим числом камер модели, учитывая также вероятность внутриклеточной солюбилизации наночастиц.

Однако, в эксперименте с НЧ NiO выход накопления ингалируемого материала на «плато» был не плавно растянутым во времени, а практически завершившимся уже к самому раннему (3-месячному) сроку оценки. При стабильном уровне экспозиции такая кинетика задержки быть могла предположительно объяснена только тем, что в еще более ранние сроки элиминация этих НЧ происходила с существенно более высокими константами скорости, которая в дальнейшем снижалась либо ступенчато, либо постепенно. Первое допущение требовало бы построения двух или нескольких отдельных моделей линейной кинетики для разных периодов, а второе – введения в модель

некоей математической функции, описывающей постепенно замедляющееся снижение ее констант во времени с относительно быстрым выходом их самих на практически постоянное значение. Исходя из всех этих допущений, в математическую модель легочной задержки НЧ NiO взамен идентифицированных для модели задержки НЧ Fe₂O₃ постоянных значений констант скорости перехода из камеры свободных частиц в камеры, соответствующие пулам частиц, фагоцитированных альвеолярными макрофагами (константа $k_{21} = 0,5$) и нейтрофильными лейкоцитами (k_{31} =0,15), были включены функции 0,5+,5*e^{-.1*t} и 0,15+1,35*e^{-.1*t}, соответственно.

В результате всех этих преобразований модельный прогноз накопления NiO в легких вполне удовлетворительно отразил экспериментальные результаты в отношении как относительно низкой высоты «плато», так и быстроты его достижения. При ЭТОМ достигнутый равновесный уровень задержки, прогнозируемый моделью, к концу 10-месячного эксперимента лежит в пределах доверительного интервала среднего значения фактического накопления наночастиц в легких.

Как было сказано выше, нет оснований отрицать возможность и пассивной пенетрации (диффузии) наночастиц через клеточную мембрану любой клетки. В Главах 5 и 6 были показаны электронные микрофотографии визуализации накопления НЧ в альвеолоцитах типа I и типа II, которое с рассматриваемых позиций легочной токсикокинетики частиц является промежуточной фазой их транслокации через альвеолярную мембрану, чему в нашей модели соответствует переход из камеры Х₁ в камеру Х₄. Этой моделью он рассматривается, по сути диффузия, как пассивная HO нельзя исключить какую-то роль дела, физиологического (клеточно-опосредованного) компонента. С другой стороны, участвующие в нем клетки, образующие альвеолярную мембрану, могут быть повреждены действием цитотоксичных частиц. Во всяком случае, в альвеолоците типа II зафиксирована выраженная дезорганизация мембран мультиламеллярного предположить, что такое повреждение этих органелл, тельца и можно

участвующих в образовании сурфактанта, может привести к нарушениям легочной механики (а тем самым – и внутрилегочного перемещения наночастиц).

НЧ видны и в ольфакторной области головного мозга, где они обнаруживаются только в миелиновой оболочке внутримозговых нервных волокон и сопряжены с очаговой демиелинизацией. Такая локализация может быть объяснена транслокацией НЧ со стороны ольфакторного эпителия носовой полости, в которой они, как хорошо известно, отлагаются в значительной степени напрямую в мозг вдоль волокон обонятельного нерва.

общее накопление Fe₂O₃ и NiO в Однако мозгу крыс оказалось определения ЭПРнедостаточным ДЛЯ количественного С помощью идентифицировать спектроскопии, что не позволяет рассматриваемый токсикокинетический механизм в структуре многокамерной модели.

Таким образом, наиболее существенная адаптация исходной модели к условиям воздействия наночастиц связана как с необходимостью математического описания физиологических механизмов их элиминации из легких и внутрилегочной транслокации, так и кинетики растворения *in vivo* при том, что относительный вклад последнего может быть различным для наночастиц разной химической природы.

Повреждение указанных физиологических механизмов особо токсичными наночастицами или же ослабление этих механизмов в результате изменения общей защитной реактивности организма на фоне хронической интоксикации может обусловить нелинейный характер кинетики легочной задержки таких частиц.

Токсическое действие изученных НЧ именно на легочные фагоциты особо интересно не только потому, что оно неблагоприятно влияет на функцию этих клеток в процессе самоочищения легких и тем самым – на отправную точку токсикокинетики отлагающихся в них НЧ, но и как показатель для сравнительной оценки *in vivo* цитотоксичности этих НЧ в более общем значении этого термина. Как уже было упомянуто, усиленная мобилизация новых НЛ, преобладающая над мобилизацией AM, является механизмом частичной компенсации того

макрофагов, которое вызывается цитотоксическим действием разрушения фагоцитируемых частиц. Было давно уже найдено, что такое усиление мобилизации как новых АМ, так и НЛ контролируется массой образовавшихся продуктов разрушения макрофагов (ПРМ) и особенно их липидной фракции (Привалова Л.И. с соавт., 1980; Privalova L.I. et al., 1987; Katsnelson B.A., Privalova L.I., 1984; Katsnelson B.A. et al., 1994, 1997). Поэтому, чем более цитотоксичны для АМ частицы, отложившиеся в пульмонарной области (или чем выше введенная и/т доза ПРМ, полученных асептически путем замораживанияоттаивания или ультразвукового разрушения не активированных перитонеальных макрофагов), тем выше отношение НЛ/АМ в полученной затем БАЛЖ. Этим обусловлено значение отношения как данного косвенного, НΟ высокоинформативного сравнительного показателя цитотоксичности частиц.

Используя этот показатель, показано (Глава 3), что металлсодержащие НЧ значительно более цитотоксичны, чем МЧ того же вещества, причем эта цитотоксичность тем выше, чем мельче НЧ.

Однако при заданном нано-размере величина индекса цитотоксичности НЛ/АМ зависит от химической природы НЧ. Как подробно описано в Главе 3, при параллельном тестировании показано, что нано-серебро намного более цитотоксично, чем нано-золото: при среднем диаметре частиц, соответственно, 49 нм и 50 нм и дозе 0,2 мг каждого среднее отношение НЛ/АМ было равным, соответственно, 2,47±0,33 и 0,63±0,13 (в контроле 0,14±0,023; P<0,05).

Ультраструктурные изменения клетки, обнаруживаемые при просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), также не одинаковы при действии разных металлов: например, НЧ серебра вызывают значительно более выраженное повреждение митохондриальных мембран и крист, чем НЧ золота (Katsnelson et al., 2013), а НЧ оксида меди – то же по сравнению с субмикронными частицами, имеющими ядро металлической меди, покрытое меднооксидным слоем (Privalova L.I. et al., 2014). Неодинаковая растворимость, при инкубации этих НЧ в модельных средах (надосадочной БАЛЖ или сыворотке крови), является одним из объяснений их неодинаковой цитотоксичности. Неодинаковая

способность разных металлов к запуску внутриклеточной генерации ROS, приводящей к так называемому оксидативному стрессу, хорошо известна (Frölich E., 2013), но в наших собственных экспериментах не исследовалась.

Как уже было отмечено выше, при сопоставлении концентрации «ямок» на поверхности фагоцитов, обнаруживаемых с помощью пкАСМ, с показателем НЛ/АМ можно было видеть, что чем цитотоксичнее наночастицы (из-за их мельчайших размеров или их химической природы), тем более жадно эти частицы поглощаются клетками. Этот феномен легко объясним тем, что продукты разрушения макрофага стимулируют не только мобилизацию АМ и НЛ, но и их фагоцитарную активность, как было давно показано в эксперименте при инкубации макрофагов с 1-микронными полистирольными частицами с добавлением или без добавления ПРМ (Privalova L.I. et al., 1995).

Соотношение между размерами частиц и их токсичностью на органосистемном уровне оказалось не столь однозначным, как на клеточном. Например, субхроническая токсичность НЧ магнетита хотя и оказалась более высокой по сравнению с токсичностью 1-микрометровых МЧ, однако *внутри* нанометрового диапазона зависимость некоторых токсических эффектов от диаметра частиц была обратной, что особенно характерно для органов, богатых клетками РЭС и поэтому, активно накапливающих НЧ из крови – в частности, для печени и селезенки (Katsnelson B.A. et al., 2010, 2011).

Так, частности, некоторые морфометрические характеристики В гистологических срезов печени свидетельствовали более высоком 0 гепатотоксическом действии магнетита 50 нм по сравнению с магнетитом 10 нм (несмотря на то, что последний, как было показано выше, более цитотоксичен), при том, что оба класса наночастиц оказались более гепатотоксичными, чем микрочастицы того же магнетита.

Отметим, что уже при диаметре 1 мкм частицы магнетита в печени и селезенке практически не обнаруживаются, а это может быть объяснено их малой способностью к диффузионной пенетрации через серозную оболочку брюшной полости в кровь. Отметим также более высокое накопление железооксидных НЧ

Fe₃O₄ обоих наноразмеров в селезенке по сравнению с печенью, что было обнаружено и при хронической ингаляции 14-нанометровых НЧ Fe₂O₃.

В сравнительном эксперименте с НЧ NiO соотношение между размерами частиц внутри нанометрового диапазона (11 нм и 25 нм) и их токсичностью также оказалось не однозначным.

Кроме того, была обнаружена и разница в накоплении НЧ в органах. Так, концентрация никеля, определяемая методом ААС в печени одинакова как при введении 11 нм НЧ так и 25 нм, однако в селезенке при действии НЧ 11 нм никеля накопилось статистически значимо меньше (23,8±2,2 мкг/г), чем 25 нм (36,8±5,7 мкг/г), в обоих органах намного выше, чем в органах контрольных крыс.

Как было подчеркнуто в Главе 4, такая разница в накоплении может быть объяснена сложными соотношениями между более высокой способностью мельчайших НЧ к пенетрации в кровь из первичного депо и затем в клетки органов из крови, с одной стороны, и их менее длительной ретенцией в клетках ввиду большей растворимости и большей цитотоксичности, с другой. Баланс противонаправленными токсикокинетическими между ЭТИМИ механизмами зависит от конкретных размеров и скоростей растворения частиц. НЧ NiO изучаемых размеров имели достаточную высокую растворимость даже в дистиллированной воде (за 100 часов растворяются 40 % частиц как 11 нм, так 25 нм), тем не менее, в сыворотке растворение происходит еще интенсивнее – 57 % растворяются НЧ 25 нм и гораздо сильнее растворяются 11 нм – 83 % за это же время. Это позволяет предположить более интенсивную солюбилизацию меньших наночастиц в организме, что с одной стороны, может усилить их резорбтивную токсичность, но с другой – снизить накопление таких НЧ в органах, и тем самым снизить токсическое поражение последних.

Таким образом, общий вывод о неоднозначности значения размера металлооксидных частиц в пределах нанометрового диапазона как характеристики, определяющей уровень их органно-системной токсичности, подтвердился.

При равном размере НЧ накопление металлов в тех же органах, очевидно, контролируется сравнительной растворимостью И сравнительной цитотоксичностью, определяемыми химической природой металла. Так, при субхронической затравке равноразмерными НЧ серебра и золота (Katsnelson B.A. al.. 2013), более растворимое И более цитотоксичное нано-серебро et накапливалось и в печени (0,12±0,01 мг на г сухой массы), и в селезенке $(0,40\pm0,04 \text{ мг})$ в меньшем количестве, чем нано-золото (соответственно, $0,20\pm0,02$ мг и 0,50±0,1 мг; по печени разница значима при P<0.01). Напротив, те же самые различия растворимости естественно приводят к большему накоплению серебра, чем золота в почках, через которые выводятся не столько сами НЧ, сколько перешедшие из них в кровь ионы металла: соответственно, 0,26±0,09 мг и 0,010±0,001 мг на г сухой массы (P<0,05).

Если соединения того или иного металла обладают каким-либо специфическим токсическим эффектом, то этот эффект может оказаться характерным и для токсичности НЧ, содержащих этот металл. Так, например, обнаружено, что НЧ магнетита вызывали при субхронической затравке ими крыс красной крови, которая реакцию со стороны может быть связана со специфической ролью железа в кроветворении. Резкое повышение числа ретикулоцитов свидетельствует о стимуляции эритропоэза, которая в случае воздействия 10-нанометровых частиц, по-видимому, достигает степени, проявляющейся значимым повышением общего числа эритроцитов и содержания гемоглобина. Найденный повышенный уровень МДА в сыворотке крови, может быть также связан с известным влиянием железа на свободно-радикальные процессы. (Тиньков, 2012; Меньщикова, 2008; Jomova K., 2011; Jugan M.L., 2010).

Были отмечены относительно специфичные для токсических эффектов никеля изменения показателей клеток красной крови, свидетельствующие о фазовой стимуляции эритропоэза. При низкоуровневых ингаляционных нагрузках и в кратковременном пилотном эксперименте, и к 3-месячному сроку основного эксперимента видны признаки стимуляции эритропоэза, а именно повышенное содержание гемоглобина, повышенное число эритроцитов с увеличенной

пропорцией ретикулоцитов, повышенный гематокрит. Однако в последующие сроки о возможной реакции костного мозга говорило только статистически значимое повышение пропорции ретикулоцитов. Влияние никеля на эритропоэз и фазовые изменения показателей красной и белой крови давно описаны в литературе (Могилевская О.Я., 1963; Рыжковский В.Л. с соавт., 1974; Но Ј.Ј., 1996; Sunderman F.W., 1982). Проявление реакции гиперергического типа (увеличение доли эозинофилов в отпечатках органов и активация реакции специфического лизиса лейкоцитов после ингаляции НЧ NiO (15,84±2,28) по сравнению с контролем (7,56±0,74), также может быть связано со свойством никеля как аллергена (Lee S. et al., 2016).

В последнее время появляются исследования аллергенного действия и наночастиц Ni однако следует отметить острую и общепризнанную, но все еще неудовлетворительно решенную проблему «наночастиц и аллергии» (Radauer-Preiml I., 2016), так как выраженный эозинофильный ответ мы наблюдали в ранее проведенных экспериментах (Minigalieva I.A., 2018). Возможно, что HЧ металлов и их оксидов оказывают особую способность вызывать токсическое воспаление гиперергического типа, однако для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные специально поставленные эксперименты.

В целом, показано, что химическая природа наночастиц определяет различия не только их цитотоксичности, но и органо-системной токсичности, а также полиорганной генотоксичности.

Найдена более высокая генотоксичность серебра по сравнению с золотом в печени, селезенке, костном мозге и крови (при статистической значимости этого различия для печени и селезенки), хотя в почке этот эффект не проявился. Это можно объяснить показанным выше меньшим накоплением в ней серебра по сравнению с золотом (Katsnelson B.A. et al., 2013).

Генотоксичность, проявляющаяся усилением фрагментации ДНК в экспериментах при субхронической внутрибрюшинной экспозиции НЧ, была отмечена и в хронических ингаляционных экспериментах, подробно описанных в Главе 5. Так, НЧ NiO во все три срока эксперимента проявляют выраженное

генотоксическое действие, оцененное с помощью Кфр в ядросодержащих клетках крови, причем происходит нарастание этого эффекта с увеличением времени воздействия. При хронической ингаляционной экспозиции к НЧ Fe₂O₃ также наблюдалось статистически значимое во все сроки эксперимента повышение Кфр, оцененного в клетках печени и костного мозга. Этот результат особо важен в связи с тем, что электродуговая сварка, в том числе так называемых мягких (т.е. нелегированных) сталей признана большого на основании числа онкоэпидемиологических данных производственным процессом, вызывающим развитие рака у человека (СанПиН 1.2.2353-08). Между тем, в составе сварочного аэрозоля преобладает субмикронная, в т.ч. нанометровая фракция Fe₂O₃ – вещества, не обладающего канцерогенностью в микрометровом диапазоне. Показанная генотоксичность НЧ Fe₂O₃ при ингаляционном воздействии даже в относительно невысокой концентрации может рассматриваться как объяснение канцерогенности сварочного аэрозоля даже при отсутствии в его составе таких облигатных канцерогенов, как хром, никель и др.

С практических позиций регуляторной токсикологии и оценки рисков для здоровья, обусловленных воздействием наноматериалов, принципиально важно то, что для НЧ генотоксичность *in vivo* манифестируется при таком низком уровне экспозиции, при котором их системное токсическое действие на организменном уровне еще мало выражено. По-видимому, для определенных наноматериалов не столько системная токсичность, сколько генотоксичность (и тем самым – вероятная канцерогенность) должна рассматриваться как лимитирующий риск.

Для любых потенциально вредных веществ установление выполнимых стандартов допустимой экспозиции к металлсодержащим наночастицам, как бы они ни назывались и каков бы ни был их юридический статус в той или иной стране, опирается на одну и ту же, признаваемую открыто или принимаемую по умолчанию принципиальную предпосылку: созданные эволюцией защитные и компенсаторные механизмы дают возможность человеческому организму адаптироваться к неким низким уровням той или иной вредной экспозиции без заметного нарушения здоровья и даже без уловимого повышения риска вредных стохастических эффектов над фоновым уровнем. Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что организм подобным же образом не беззащитен и по отношению к металлсодержащим НЧ.

С другой стороны, полученные данные подтверждают преобладающие представления, согласно которым вещество, даже относительно безвредное и малоопасное в обычном состоянии (подобно магнетиту), может оказаться выраженотоксичным в наносостоянии, а те вещества, вредное действие которых на организм несомненно и в виде частиц микрометрового диапазона, составляющих преобладающую промышленных часть массы аэрозолей, становятся гораздо опаснее, когда действуют в форме НЧ. При этом с уменьшением размеров внутри нанодиапазона токсичность на клеточном уровне усиливается, но на органо-системном может по некоторым эффектам снижаться, оставаясь все же более высокой по сравнению с даже мельчайшими частицами микрометрового диапазона.

Хотя проблема оценки и управления рисками для здоровья, связанными с наноматериалами, обсуждается в литературе сравнительно давно (например, (Yokel R.A., MacPhail R.C., 2011; Murashov V. et al., 2011), однако общепринятых принципов установления соответствующих стандартов все еще нет, и имеются лишь единичные примеры обоснования допустимых уровней экспозиции для конкретных искусственных НЧ в воздухе рабочих помещений. Разработка сценариев управления рисками чаще всего проводится с оговоркой, что такие уровни неизвестны (Grosco A. et al., 2010) и поэтому следует руководствоваться так называемым «принципом предосторожности», который в данном случае означает ограничение экспозиции к НЧ до такого низкого уровня, который только обеспечен. Тем необходимость быть не менее, установления может предположительно безопасных концентраций НЧ признается несомненной, и в некоторых странах такие величины начали приниматься в качестве обязательных или хотя бы рекомендательных нормативов.

Так, в США Национальный Институт профессиональной безопасности и здоровья (NIOSH) предложил так называемый REL (Recommended Exposure Limit)

на уровне 0,3 мг/м³ для «ультратонких» частиц TiO₂ (в том числе, для искусственных HЧ), что в 8 раз ниже, чем REL 2,4 мг/м³ для «тонких» (т.е. мельчайших микрометровых) частиц того же вещества (CDC and NIOSH, 2011). При этом данный норматив отнесен к частицам *любых* нано-размеров, хотя нано-порошки диоксида титана выпускаются на рынок с различными диаметрами частиц от 10 нм до 50 нм. Сходный и даже более жесткий подход к установлению групповых стандартов безопасности для искусственных наноматериалов был принят в 2010 году Австралийским правительственным агентством «Safe Work Australia». В частности, для любых нанокристаллов, квантовых точек, HЧ керамических оксидов и HЧ металлов ориентировочный норматив, называемый BEL (Benchmark Exposure Level,) должен быть равен 0,066WEL (где WEL означает Workplace Exposure Limit, то есть «предел экспозиции на рабочем месте» к тому же веществу в обычном состоянии) – другим словами, речь идет о снижении норматива в 15 раз.

Исходя из изложенных выше подходов и на основе экспериментальных данных предложены для рассмотрения в качестве ориентировочно безопасных для НЧ в воздухе рабочих помещений следующие концентрации: для оксидов железа – 0,4 мг/м³, для золота – 0,2 мг/м³, для серебра – 0,1 мг/м³ и для оксидов меди – 0,05 мг/м³.

Полученные экспериментальные результаты ингаляционного эксперимента с НЧ Fe₂O₃ в совокупности с методическими соображениями, представленными при их обсуждении в Главе 5, позволяет расценить среднюю за полный период экспозиции концентрацию 1,14 мг/м³, как пороговую при хроническом ингаляционном воздействии (Lim_{ch}) в том значении этого термина, который принят в отечественной профилактической токсикологии.

В соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» так называемый коэффициент запаса, служащий для перехода от пороговой к предельно допустимой концентрации, обычно устанавливается в пределах от 3 до 20. Следует учесть, что по абсолютному большинству эффектов испытанная концентрация является фактически не действующей. Кроме того, 2,5-кратное удлинение экспериментального периода по сравнению с предусмотренным этими МУ само по себе вносит значительный запас надежности в оценку величины Lim_{ch} . По этим двум соображениям, мы сочли возможным принять величину коэффициента запаса $\approx 2,9$, близкую к указанной минимальной, и тем самым, предложить к утверждению норматив среднесменной ПДК в воздухе рабочей зоны как для дижелеза триоксида (Fe₂O₃) в форме наночастиц на уровне 0,4 мг/м³.

Эта величина в 15 раз ниже среднесменной ПДК 6 мг/м³, установленной в ГН 2.2.5.1313-03 для того же вещества в обычной форме, и можно отметить, что снижение действующих нормативов на один-полтора порядка при установлении допустимых уровней экспозиции для металлических и металлооксидных наночастиц соответствует международной практике. Это предложение было принято Роспотребнадзором, и затем в ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 13.02.2018 была внесена следующая формулировка среднесменная концентрация «диЖелезо триоксид наночастицы» 0,4 мг/м³.

Какие бы низкие уровни НЧ-экспозиции ни были установлены как допустимые, особая потенциальная опасность этого класса загрязнителей воздуха обусловливает высокую целесообразность поиска возможности сделать организм менее чувствительным к их вредному действию с помощью комплекса неспецифических и специфических биопротекторов, которые в профилактически эффективных дозах не имели бы собственных побочных эффектов. Общая концепция такой «биологической профилактики», теоретические предпосылки и многочисленные примеры ее реализации публиковались неоднократно, в том числе, в обобщающих статьях (например, Кацнельсон Б.А. с соавт., 2014; Katsnelson B.A. et al., 2014, 2015). Этот более, чем 30-летний опыт позволил начать продолжающиеся и в настоящее время исследования того же направления, но уже и в области нанотоксикологии металлов.

В частности, те эксперименты, результаты которых представлены в Главе 7, показали, что органо-системная субхроническая токсичность и связанная с нею

полиорганная генотоксичность наночастиц серебра, окиси меди и оксида никеля могут быть существенно ослаблены, если интоксикация развивается на фоне перорального назначения многокомпонентных биопрофилактических комплексов (БПК), в состав которых (подобранный с учетом как общих токсикокинетических и токсикодинамических механизмов действия металлсодержащих НЧ, так и специфики действия конкретного металла) входят пектин, поливитаминнополиминеральные препараты, препараты отдельных витаминов И микроэлементов, некоторые аминокислоты НЭЖК омега-3. И класса

выводы

1. Выявлены наиболее общие закономерности вредного действия на организм наночастиц, влияние их химической природой, размера, растворимости и способности к пенетрации через клеточные мембраны, на особенности их биологической агрессивности на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях:

• при сопоставимом размере металлсодержащих наночастиц цитотоксичность и системная токсичность зависят от их химической природы, включая специфические токсические эффекты, характерные для этого металла. В частности, наночастицы магнетита вызывают повышение общего числа эритроцитов, содержания гемоглобина, числа ретикулоцитов (при введении магнетита 10 нм – в 5 раз, при введении 50 нм – в 3 раза), повышение в 1,5 раза уровня малонового диальдегида в сыворотке крови; после ингаляции наночастиц оксида никеля наблюдали активацию реакции специфического лизиса лейкоцитов (15,84±2,28) по сравнению с контролем (7,56±0,74), которая связана со свойством никеля как аллергена;

 изученные наночастицы вызывают однотипные ультраструктурные изменения клеток, такие как повреждение митохондрий с частичной или полной потерей крист, вакуолизация цитоплазмы, образование в ней концентрических мембранных включений, в мозгу – участки демиелинизации нервных волокон, однако возможна разница в распределении внутри фагоцитоспособных клеток наночастиц различной химической природы (наночастицы серебра имеют большую тропность к митохондриям, но меньшую способность к пенетрации внутрь ядра, чем наночастицы золота);

• наночастицы, всех изученных металлов обладают генотоксическим действием *in vivo*, которое проявляется увеличением коэффициента фрагментации ядерной ДНК различных органов и тканей даже при таком низком уровне экспозиции, при котором их системное токсическое действие на организменном уровне мало выражено;

задержка и распределение металлических и металлооксидных наночастиц в организме управляются как физиологическими, так и физикохимическими процессами, а именно зависят от цитотоксичности, высокой способностью диффузионному наночастиц К проникновению через мембраны, наряду с активным эндоцитозом, осуществляемым различными клетками, и постепенным растворением *in vivo*. Относительный вклад перечисленных механизмов в эти токсикокинетические процессы для разных наночастиц неодинаков в зависимости от их размера и химического состава результатом чего является неодинаковое накопление даже равноразмерных наночастиц в организме (например, при внутрибрюшинном введении равноразмерных наночастиц Ag и Au, более растворимые и более цитотоксичные серебра накапливается в печени (0,12±0,01 мг на г сухой массы) в меньшем количестве, чем золото $0,20\pm0,02$ мг (P<0,01);

• наночастицы обладают более выраженным вредным действием как на органно-системном уровне клеточном, так И на ПО сравнению С микрочастицами соответствующего химического состава, внутри нанометрового диапазона зависимость токсичности от размера (при заданной массовой дозе) различна для качественно разных эффектов;

2. Рассмотрены общие принципы гигиенической регламентации наночастиц на основании полученных экспериментальных данных, которые позволяют утверждать, что:

• организм не беззащитен и по отношению к металлсодержащим наночастицам, поэтому установление нормативов типа ПДК или ОБУВ для содержания наночастиц не менее оправдано, чем для содержания микрочастиц;

 такие нормативы по общетоксическому действию должны быть существенно ниже установленных для микрочастиц той же химической природы;

• необходимо учитывать такие свойства наночастиц как химическая природа, размер, растворимость и способность к пенетрации через клеточные мембраны в связи с влиянием на особенности их токсического действия;

 наночастицы могут нормироваться без подразделения по субфракциям нанодиапазона;

3. Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что реагирование защитно-компенсаторных механизмов организма на наночастицы в основном имеет общие закономерности, как и на микрочастицы (например, активация реакции альвеолярного фагоцитоза), что обусловливает возможность использования аналогичных подходов к установлению допустимых уровней загрязнения воздуха металлсодержащими наночастицами, в частности, подхода, основанного на экстраполяции и интерполяции с имеющим норматив микрометровым аналогом по химической природе;

4. В качестве одного из ускоренных методов *in vivo* для регламентации наночастиц рационально использовать сравнительную оценку реакции глубоких дыхательных путей по изменению цитологического (приток общей клеточности, абсолютное содержание нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов, их отношение, фагоцитарная активность) и биохимического состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа, полученной через 24 часа после интартрахеального или ингаляционного введения металлсодержащих наночастиц в связи с тем, что наночастицы, которые более цитотоксичны для альвеолярных макрофагов, предположительно более цитотоксичны и для любых других клеток, внутрь которых они попадают;

5. На основе экспериментальных данных проведенного хронического ингаляционного эксперимента обоснована и утверждена среднесменная предельно допустимая концентрация наночастиц диЖелезо триоксида в воздухе рабочих помещений 0,4 мг/м³;

6. Многокамерная модель, учитывающая как физиологические механизмы элиминации из легких и внутрилегочной транслокации, так и кинетики растворения *in vivo* металлсодержащих наночастиц (относительный вклад

последнего может быть различным для наночастиц разной химической природы), дает адекватное математическое описание задержки металлических наночастиц в легких при хронической ингаляционной экспозиции;

7. Резистентность организма к цитотоксичности, системной токсичности и генотоксичности металлсодержащих наночастиц может быть существенно повышена с помощью комплекса биопротекторов, подобранных с учетом как специфики действия конкретного металла, так и общих токсикокинетических и токсикодинамических механизмов вредного действия таких наночастиц, что позволяет использовать биологическую профилактику как один из методов управления риском здоровью, создаваемым металлическими наночастицами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Учитывать в работе органов и организаций Роспотребнадзора внесенную в ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 13.02.2018 среднесменную концентрацию «диЖелезо триоксид» наночастицы 0,4 мг/м³.

Для обоснования гигиенических нормативов содержания наночастиц в воздухе рабочих помещений можно использовать подход, базирующийся на экстраполяции и интерполяции в рядах с имеющим норматив микрометровым аналогом по химической природе.

Использовать оценку реакции альвеолярного фагоцитоза на действие НЧ в качестве одного из ускоренных методов для сравнительной оценки токсичности НЧ *in vivo* в более общем значении этого термина.

Результаты экспериментальной апробации биопрофилактического комплекса, понижающего токсическое, цитотоксическое и генотоксическое действие НЧ CuO позволяют обосновать целесообразность использования тех же биопротекторов биологической профилактики В целях хронических профессиональных и производственно обусловленных заболеваний у рабочих, занятых в производстве черновой меди. Оценка эффективности такого курса биопрофилактики должна проводиться на основании клинико-лабораторного обследования непосредственно перед началом курса и сразу после его окончания.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- АМ- альвеолярные макрофаги
- А/Г- альбумин-глобулинновый индекс
- ААС атомно-абсорбционная спектроскопия
- АЛК дельта аминолевулиновая кислота
- АлТ- аланин- аминотрансфераза
- АсТ аспартат-аминотрансфераза
- АЭС атомно-эмиссионная спектроскопия
- БАД биологически активная добавка
- БАЛЖ-жидкость бронхоальвеолярный лаваж
- БПК биопрофилактический комплекс
- в/б-внутрубрюшинное
- ВОЗ- Всемирная Организация Здравоохранения
- ГГТП- гамма-глутамилтрансфераза
- и/т-интратрахеальное
- Кфр коэффициент фрагментации
- ЛД₅₀ среднесмертельная доза
- ЛДГ- лактатдегидрогеназа
- МДА малоновый диальдегид
- МЧ микрочастицы
- НЛ- нейтрофильные лейкоциты
- НЧ наночастицы
- ОБУВ ориентировочно безопасный уровень воздействия
- ПДАФ полиморфизм длин амплифицированных фрагментов ДНК
- ПДК- предельно допустимые концентрации
- ПЭМ просвечивающая электронная микроскопия
- СДГ сукцинатдегидрогеназа

- СЭМ- сканирующая электронная микроскопия
- ЭПР электронный парамагнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аминокислоты в медицине / В.И. Западнюк, Л.П. Купраш, М.У. Заика, И.С. Безверхая. Киев: Здоровья, 1982. С. 58-65.
- Андреева Л.И. Модификации метода определения перекиси липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
- Архипова О.Г. Методы исследований в профпатологии. М.: Медицина, 1988. – 208 с.
- Афонина С.Н. Химические компоненты чая и их влияние на организм / С.Н. Афонина, Е.Н. Лебедева // Успехи современного естествознания. – 2016. – № 6. – С. 59-63.
- Балезин С.Л. Анализ закономерностей комбинированного токсического действия марганца и хрома на организм в эксперименте: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Балезин Сергей Леонидович. – Л., 1989. – 20 с.
- Бестужева С.В. Определение церулоплазмина в сыворотке крови модифицированным методом Ревина // Клиническая биохимия / С.В. Бестужева, В.Г. Колб. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 219-220.
- Биологическая профилактика как комплексное воздействие, повышающее резистентность организма к действию вредных факторов производственной среды / Б.А. Кацнельсон, Т.Д. Дегтярёва, Л.И. Привалова, С.В. Кузьмин и др. // Вестник Уральской медицинской академии наук. – 2005. – №2. – С. 70-76.
- Биохимические эффекты у рабочих, подвергающихся влиянию аэрозолей металлургического производства меди, содержащих наночастицы / В.Б. Гурвич, Б.А. Кацнельсон, В.О. Рузаков, Л.И. Привалова и др. // Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения: Матер. междун. конф. 20-21 октября 2016 г. Екатеринбург, С. 21-23.

- Васюков Г.Ю. Морфология жизненно важных органов крыс при внутривенном введении магнитолипосом / Г.Ю. Васюков // Вестник Российского Государственного медицинского университета. – 2011. – Вып. 1(3). – С. 220-221.
- Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биомембранах / Ю.А.
 Владимиров, А.И. Арчаков. М.: Наука, 2003. С. 230-272.
- Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe₃O₄ / И.В. Мильто, Г.А. Михайлов, А.В. Ратькин, А.А. Магаева // Бюллетень Сибирской медицины. – 2008. – Т. 7(1). – С. 32-36.
- Влияние наночастиц железа на дыхательную функцию крови. / М.Ю. Скорокина, М.З. Федорова, Е.А. Сладкова, Р.В. Деркачев и др. // Ярославский педагогический вестник.– 2010. – Т.3(2). – С. 101-106.
- Воздух рабочей зоны. Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании: ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628: 2007.
- 14. Волков М.С. Глутаминовая кислота: Биохимическое обоснование практического использования / М.С. Волков, А.М. Генкин, Н.А. Глоток. – Свердловск, 1975. – 119 с.
- Вредные вещества в окружающей среде / Под общ. ред. В.А. Филова. СПб.: НПО "Профессионал", 2005. – 461 с.
- Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды: ГН 1.2.2633-10. Утв. Постановлением гл. сан. врача РФ от 25.05.2010 N 60. – М., 2010.
- Гонохова М.Н. Сравнительная цитоморфологическая характеристика селезенки крыс при воздействии пестицидов / М.Н. Гонохова, Т.В. Бойко, А.А. Ельцова // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. С. 1056-1056.
- Государственный реестр лекарственных средств: в 2 т. М.: Медицинский совет, 2009. Т.2. Ч.1. 568 с.

- Государственный реестр лекарственных средств: в 2 т. М.: Медицинский совет, 2009. Т.2. Ч.2. 560 с.
- Гусель В.А. Справочник педиатра по клинической фармакологии / В.А. Гусель, И.В. Маркова. Л.: Медицина, 1989. 318 с.
- Гуськова О.А. Оценка токсичности химической продукции с использованием альтернативных методов / О.А. Гуськова, Н.В. Завьялов, Е.Л. Скворцова // Токсикологический вестник. – 2013. – №6. – С. 34-39.
- Дегтярева Т.Д. Экспериментально-теоретическое обоснование принципов биологической профилактики хронических интоксикаций неорганическими соединениями: дисс. ... докт. мед. наук / Дегтярева Тамара Дмитриевна. – Екатеринбург, 2002. – 359 с.
- Демченко Н.П. Влияние препаратов глутаминовой кислоты на некоторые показатели окислительных процессов при пневмонии у детей первого года жизни: дисс. ... канд. мед. наук / Демченко Н.П. – Свердловск, 1970. – 248 с.
- Донченко Л.В. Производство пектина / Л.В. Донченко, Н.С. Карпович, Е.Г. Симхович. – Кишенев, 1993. – 183 с.
- Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П. Евстигнеева, И.М. Волков, В.В. Чудинова // Биологические мембраны. 2003. № 2. С. 119-137.
- 26. Елизарова О.Н. Пособие по токсикологии для лаборантов / Сост.: О.Н Елизарова, Л.В. Жидкова, Т.А. Кочеткова. М.: Медицина, 1974. 77 с.
- 27. Ждахина К.С. Влияние введения солей глутаминовой кислоты на электролитный состав мочи белых крыс / К.С. Ждахина // Биологическое действие глутаминовой кислоты на организм в эксперименте и клинике: Сб. науч. тр. – Свердловск, 1966. – С. 73-87.
- Зенков Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: Наука, 2004. – 343 с.
- 29. Избирательная цитотоксичность наночастиц марганца в отношении клеток глиобластом человека / И.А. Разумов, Е.Л. Завьялов, С.Ю. Троицкий, А.В.

Ромащенко и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 2. – С. 114-118.

- Ильясов И.Р. Исследование антирадикальной активности композиции на базе диквертина: автореф. дисс. ... канд. фарм. наук / Ильясов Игорь Равилевич. – М., 2009. – 25 с.
- Использование клеточных систем «ин витро» и «ин виво» для ускорения гигиенической регламентации малорастворимых промышленных аэрозолей: MP № 01-19/24-17.
- 32. Испытание защитной эффективности биопрофилактического комплекса по отношению к вредному действию хризотил-асбеста в эксперименте / Л.И. Привалова, М.П. Сутункова, Б.А. Кацнельсон, Т.Д. Дегтярева и др.: Тез. докл. 3-й съезда токсикологов России. – М., 2008. – С. 218-219.
- 33. Исследование пероральной токсичности одностенных углеродных нанотрубок / В.А. Шипелин, А.А. Шумакова, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87 (S5). – С. 203-204.
- Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности: СанПиН 1.2.2353-08. – М., 2008.
- Кацнельсон Б.А. Принципы биологической профилактики профессиональной и экологически обусловленной патологии от воздействия неорганических веществ / Б.А. Кацнельсон Т.Д., Дегтярева, Л.И. Привалова. – Екатеринбург, 1999. – 106 с.
- 36. Кацнельсон Б.А. Разработка средств, повышающих устойчивость организма к действию неорганических загрязнителей производственной и окружающей среде / Б.А. Кацнельсон, Т.Д. Дегтярёва, Л.И. Привалова // Российский химический журнал. – 2004. – Т.18 (2). – С. 65-71.
- 37. Киреева Е.П. Связь начального поражения почек с экологически обусловленной токсической нагрузкой организма свинцом и кадмием и его профилактика (эпидемиологическое и экспериментальное исследование): дисс. ... канд. мед. наук / Киреева Екатерина Петровна. Екатеринбург, 2007.

- Ковалева Н.Ю. Проблемы безопасности наноматериалов: нанобезопасность, нанотоксикология, наноинформатика химическая безопасность / Н.Ю. Ковалева, Е.Г. Раевская, А.В. Рощин. – 2017. – Т.1 (2). – С. 44-87.
- Комплексная медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: информационно-аналитическая и экспериментальная составляющие / В.А. Тутельян, С.А. Хотимченко, И.В. Гмошинский, А.А. Шумакова и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – №5(218). – С. 15-18.
- Котеров А.Н. Радиоадаптивный ответ in vitro нестимулированных лимфоцитов крыс по металлотионеиновому тесту / А.Н. Котеров, И.В. Филлипович // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35 (2). – С. 162-180.
- Кушнева В.С. Пектины различной степени этерификации и пектинсодержащий препарат «медетопектин» как факторы, способствующие элиминации свинца из организма (экспериментальные данные) / В.С. Кушнева, И.Г. Колтунова // Мед. труда и пром. экология. 1997. № 7. С. 27-31.
- 42. Леоненко Н.С. Сравнительный анализ токсичности и опасности химических соединений различной размерности (обзор литературы) / Н.С. Леоненко // Украинский журнал современных проблем токсикологии. 2016. №2. С. 48-61.
- 43. Маджи Д.Э. Критический обзор научной литературы о пище и питании / Д.Э. Маджи // Вкусовые добавки. 1987. Т.18. С. 269-312.
- 44. Медведева В.Н. Ранняя диагностика и классификация профессионального флюороза / В.Н. Медведева // Врачебное дело. 1990. № 3. С. 108-110.
- 45. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотниицкая. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
- Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты /
 Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков. М.: «Слово», 2006. 553 с.
- Методические рекомендации по использованию клеточных систем «ин витро» и «ин виво» для ускорения гигиенической регламентации малорастворимых промышленных аэрозолей: МР № 01-19/24-17. – Екатеринбург, 1995. – 28 с.
- Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования. – Кишинев, 1980. – 47 с.
- Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны № 2163-80. Утв. Гл. госуд. сан. врачом СССР 4 апреля 1980 г. – М., 1980.
- 50. Методические указания по использованию в лечебно-профилактических целях пектинов и пектиносодержащих продуктов. Киев, 1990. 15 с.
- 51. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны: МУ № 4000-85. –М., 1985.
- 52. Минигалиева И.А. Экспериментальное обоснование подходов к биологической профилактике вредных эффектов органических загрязнителей среды обитания и их комбинаций с токсичными металлами / Минигалиева Ильзира Амировна: дисс. ... канд. биол. наук. – Мытищи, 2009. – 181 с.
- 53. Мирогов Ю.В. Влияние перидоксина, рибофлавина, калия оротата, фолиевой и глутаминовой кислоты на восстановление работоспособности у неполовозрелых крыс / Ю.В. Мирогов, В.С. Яснецов // Фармакология и токсикология. – 1985. – № 4. – С. 110-112.
- 54. Могилевская О.Я. Токсикология редких металлов / О.Я. Могилевская. М., 1963. С. 151-164.
- 55. Морозова К.И. Влияние некоторых органических кислот на стабилизацию мембран митохондрий при воздействии кварцевой пыли / К.И. Морозова // Профессиональные болезни пылевой этиологии: Сб. науч. тр. – М., 1988. – Т.1. – С. 62-68.

- 56. Морозова К.И. Экспериментальное обоснование дозировки и схемы применения глутаминовой кислоты в целях биологической профилактики и терапии силикоза / К.И. Морозова // Профессиональные болезни пылевой этиологии: Сб. науч. тр. – М., 1986. – С. 42-47.
- 57. Морфологические изменения во внутренних органах лабораторных животных при однократном введении наночастиц Fe / H.A. Наволокин, О.В. Матвеева, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская и др. // Известия Саратовского университета. – 2011. – Т. 11(2). – С. 63-66.
- 58. Морфологические особенности органов желудочно-кишечного тракта при субхроническом воздействии нанодисперсного оксида марганца (III, IV) / М.А. Землянова, В.Н. Звездин, А.А. Довбыш, Н.Б. Кондрашова // Анализ риска здоровью. 2013. № 3. С. 55-63.
- 59. Наноразмерные соединения и перспективы ускоренного определения их цитотоксических свойств с целью гигиенического нормирования / Е.А. Сопова, О.А. Ганковская, В.И. Баранов, В.Ф. Лавров и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2010. – №2. – С. 41-44.
- 60. Нарциссов Р.П. Применение п-нитротетразоли фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека / Р.П. Нарциссов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1969. №5. С. 85-91.
- Нелина В.В. Физико-химические свойства пектиновых веществ/ Разработка и совершенствование технологий пектина и пектинопродуктов / В.В. Нелина. – Краснодар, 1996. – С. 94-95.
- 62. Новые данные к оценке силикозоопасности промышленных аэрозолей на основе коллоидного раствора кремниевой кислоты / Г.А. Подгайко, Б.А. Кацнельсон, М.Ф. Лемясев, С.Н. Соломина и др. // Профессиональные болезни пылевой этиологии: сб. науч. тр. М.: НИИГ им. Эрисмана, 1982. С. 93-100.

- Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: МР 2.3.1.2432-08. – М., 2008.
- 64. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь и др. Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
- 65. Онищенко Г.Г. О мерах по обеспечению безопасности окружающей среды и здоровья населения при разработке и внедрении нанотехнологий и наноматериалов / Г.Г. Онищенко // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2011. – № 3. – С. 28-31.
- 66. Определение частиц нанодиапазона в воздухе рабочей зоны металлургического производства / Т.С. Уланова, М.В. Антипьева, М.И. Забирова, М.В. Волкова // Анализ риска здоровью. 2015. № 1. С. 77-81.
- 67. Ориентировочные гигиенические нормативы аэрозолей наночастиц в воздухе рабочей зоны и упреждающая оценка риска / А.С. Радилов, А.В. Глушкова, С.А. Дулов, В.Р. Рембовский //Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения: Матер. междун. конф. 20-21 октября 2016 г. Екатеринбург. – Екатеринбург, 2016. – С. 58-51.
- Особенности функциональной морфологии клеток на отпечатках органов, пленочных препаратах соединительной ткани и мазках крови / Г.Г. Кругликов, В.Б. Суслов, Л.М. Лихачева, Н.Б. Странжа и др. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2014. – №4. – С. 86-92.
- Оценка острой ингаляционной токсичности аэрозоля нанодисперсного оксида марганца для задач гигиенического нормирования. Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы / М.А. Землянова, Н.В. Зайцева, В.Н. Звездин, Т.И. Акафьева: Матер. науч.-практ. конф. Волгоград, 2014. С. 44-46.

- Оценка потенциальной опасности наноразмерного оксида никеля / Н.В.
 Зайцева, М.А. Землянова, Т.И. Акафьева, В.Н. Звездин // Экология труда.
 Экология человека. 2016. №10. С. 10-16.
- Оценка эффективности адсорбции меди, цинка и хрома из щелочных растворов пектиновыми веществами / Н.И. Сухарева, Т.В. Павлов, В.А. Васькина и др. // Эфферентная терапия. – 1998. – Т. (3). – С. 66-68.
- 72. Павловская Н.А. Поведение свинца в организме человека и особенности ранней диагностики свинцовых интоксикаций / Н.А. Павловская, В.А. Кирьяков, А.В. Погабало. – М.: Лад, 1998. – 101 с.
- 73. Петин Л.М. К обоснованию предельно допустимой концентрации кремнеземсодержащих аэрозолей конденсации / Л.М. Петин // Гигиена труда и профессиональные заболевания. 1978. № 6. С. 28-33.
- 74. Пневмокониозы: патогенез и биологическая профилактика / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, О.Г. Алексеева, Е.В. Ползик – Екатеринбург: УрО РАН, 1995. – 325 с.
- 75. Потапов А.И. Международные стандарты безопасности при профессиональном воздействии наночастиц и гармонизация гигиенических походов / А.И. Потапов, А.В. Тулакин, Л.А. Луценко и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 19-21.
- 76. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.
- 77. Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны: ГН 2.2.5.3532-18. М., 2018.
- Привалова Л.И. Гигиенические аспекты неспецифического действия малорастворимых цитотоксических пылевых частиц: дисс. ... д-ра мед. наук / Привалова Лариса Ивановна. – Свердловск: МНЦ ПОЗРПП, 1990. – 389 с.
- 79. Привалова Л.И. Гигиеническое значение цитотоксического действия силикозоопасной пыли как фактора, контролирующего защитную реакцию

самоочищения легких дисс. ... канд. мед. наук / Привалова Лариса Ивановна. – Свердловск: НИИ ГТ и ПЗ, 1979. – 211 с.

- 80. Применение биомаркеров вредного влияния наноразмерных аэрозолей на организм для оценки и прогнозирования риска нарушений здоровья у работников горнодобывающих предприятий / В.П. Чащин, С.А. Горбанев, Д. Эллингсен, И. Томассен //Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения: Матер. междун. конф. 20-21 октября 2016 г. Екатеринбург. Екатеринбург, 2016. С. 59-61.
- Производство и применение наноматериалов (токсиколого-гигиенические проблемы) / Б.Н. Филатов, Л.И. Бочарова, В.В. Клаучек, А.А. Масленников и др. //Фармакология. – 2015. – Т. 16. – С. 259-266.
- Прощенко Д.А. Система тестов для оценки токсичности наночастиц оксида никеля (II) на культуре фибробластов человека / Д.А. Прощенко // Новое слово в науке и практике: гипотезы и апробация результатов исследований. – 2016. – № 23. – С. 18-22.
- 83. Реакция глубоких дыхательных путей крысы однократное на интратрахеальное введение наночастиц оксидов никеля и марганца или их комбинации ослабление ee биопротекторной премедикацией / И Б.А. Кацнельсон, И.А. Минигалиева, Л.И. Привалова // И др. Токсикологический вестник. – 2014. – № 6. – С. 8-14.
- 84. Роль церулоплазмина в устойчивости организма к рентгеновскому облучению / Н.К. Бердинских, С.Г. Антоненко, Ю.В. Волосченко, Е.Е. Чебатарев и др. // Радиобиология. 1984. №24. С. 199-203.
- 85. Рыжковский В.Л. Резорбтивное действие малых концентраций аэрозоля металлического никеля на организм / В.Л. Рыжковский, Е.В. Елфимова, М.И. Гусев //Гигиена и санитария. 1974. №11. С. 8-13.
- Самарский А.А. Математическое моделирование и вычислительный эксперимент / А.А. Самарский // Вестник АН СССР. 1979. № 5. С. 38-49.

- Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник: СП 2.2.1.3218-14. М., 2014.
- 88. Соловьёва C.H. O критериях гигиенической оценки атмосферных концентраций промышленных аэрозолей высоким с содержанием С.Н. Соловьёва, М.П. наночастиц аморфного диоксида кремния / Сутункова, Б.А. Кацнельсон //Гигиена и санитария. – 2017. – Т. 96 (12). – С. 1179-1181.
- 89. Справочник Видаль. 2010. Лекарственные препараты. М.: АстраФармСервис, 2010. – 1728 с.
- Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии / Под ред.
 С.С. Чекмана, А.П. Пелещук, О.А. Пятак. Киев.: Здоровья, 1986. 736 с.
- 91. Сравнительная и комбинированная токсичность наночастиц оксидов алюминия, титана и кремния и её ослабление комплексом биопротекторов / И.А. Минигалиева, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова и др. //Токсикологический вестник. – 2018. – Vol. 2. – Р. 18-27.
- 92. Сравнительные подходы к оценке риска и гигиенического регламентирования наноматериалов в России и Евросоюзе (на примере Норвегии) / А.В. Глушкова, А.С. Радилов, С.А. Дулов, Н.С. Хлебникова // Токсикологический вестник. 2016. №6. С. 31-35.
- 93. Сухаревская Т.М. Энтеросорбция в профилактике и коррекции экологически обусловленных нарушений здоровья / Т.М. Сухаревская, Л.М. Потеряева, Л.А. Шпагина // Сибирский стандарт жизни: экология, образование, здоровье: Тез. докл. науч. практ. конф. 12 декабря 1997 г. – Новосибирск, 1997. – С. 148-150.
- 94. Тиньков М.Н. Пероксидное повреждение белков и липидов сыворотки крови индуцированное солями железа и меди питьевой воды / А.А. Тиньков, М.Н. Рогачева, А.А. Никоноров // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012.– № 6 (142). – С. 191-194.

- 95. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном, в 92-дневном эксперименте на крысах. II. Морфология внутренних органов / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, А.А. Довбыш и др. // Вопросы питания. 2016. Т. 85 (1). С. 47-55.
- 96. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. Ш. Энзимологические, биохимические маркеры, состояние системы антиоксидантной защиты / И.В. Гмошинский, В.А. Шипелин, И.В. Ворожко, Т.Б. Сенцова и др. Вопросы питания. 2016. Т. 85 (2). С. 14-23.
- 97. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности нано и микродисперсного оксида марганца (III, IV) /Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, Е.В. Саенко и др. // Вопросы питания. 2012. Т. 81(5). С. 13-19.
- Трахтенберг И.М. Пектины в индивидуальной профилактике хронических свинцовых интоксикаций / И.М. Трахтенберг, Е. Краснюк, И. Лубянова // Токсикологический вестник. – 1998. – № 4. – С. 32-36.
- Трахтенберг И.М. Профилактическое применение пектина при хроническом воздействии свинца на производстве / И.М. Трахтенберг, В.П. Луковенко, Т.К. Короленко // На допомогу практичному лікареві: Сб. науч. тр. – Киев, 1995. – С. 132-136.
- 100. Участие полинуклеаров в альвеолярном фагоцитозе кварцевой пыли и его связь с биологической агрессивностью кварца / С.К. Старикова, Б.А. Кацнельсон, Г.В. Аронова, И.М. Шнайдман // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1970. – №9. – С.113-116.
- 101. Фатхутдинова Л.М. Токсичность искусственных наночастиц / Л.М. Фатхутдинова, Т.О. Халиуллин, Р.Р. Залялов // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90 (4). – С. 578-584.
- 102. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров. Пущино: Synchrobook, 2013. 310 с.

- 103. Хамидулина Х.Х. Международные подходы к оценке токсичности и опасности наночастиц и наноматериалов / Х.Х. Хамидулина, Ю.О. Давыдова //Токсикологический вестник. – 2011. – №6. – С. 53-57.
- 104. Хлебцов Н.Г. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц / Н.Г. Хлебцов, Л.А. Дыкман // Российские нанотехнологии. – 2011. – Т.6 (1-2). – С. 39-59.
- 105. Эколого-эпидемиологический анализ связи здоровья населения промышленных городов Среднего Урала с воздействием вредных факторов среды обитания (по материалам исследований, проводившихся в 1998-2008 гг.) / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, С.В. Кузьмин, Б.И. Никонов и др. // Охрана здоровья населения промышленных регионов: стратегия развития, инновационные подходы и перспективы: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. с междун. участием. – Екатеринбург, 2009. – С. 145-151.
- 106. Экспериментальное испытание комплекса средств биологической защиты организма от канцерогенного действия комбинации экотоксикантов: научное издание / Б.А. Кацнельсон, О.Г. Макеев, Т.Д. Дегтярева и др. // Токсикологический вестник. 2007. № 3. С. 15-20.
- 107. Энтеросорбция / Под ред. Н.А. Белякова. Л.: Центр сорбционных технологий, 1991. 330 с.
- 108. Эффективность ольфакторного транспорта наночастиц оксида марганца (II) при однократном или многократном интраназальном введении / А.В. Ромащенко, М.Б. Шарапова, Д.В. Петровский, М.П. Мошкин // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21 (3). С. 304-311.
- 109. Юрова А.В. Структурно-функциональная оценка влияния никеля на организм животных и культуру клеток: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Анжелика Вячеславовна Юрова. – М., 1989. – 19 с.
- 110. A role for surface reactivity in TiO₂ and quartz-related nanoparticle pulmonary toxicity / D.B. Warheit, K.L. Reed, C.M. Sayes et al. //Nanotoxicology. 2009. Vol.3 (3). P. 181-187.

- 111. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal nanogold in a rabbit model / S.J. Bakri, J.S. Pulido, P. Mukerjee et al. // Retina. 2008. Vol.28 (1). P. 147-149.
- 112. Acute and chronic toxicity of nickel oxide nanoparticles to Daphnia magna: The influence of algal enrichment / N. Gonga, K. Shaoc, G. Lia, Y. Sun // NanoImpact. – 2016. – Vol.34. – P. 104-109.
- 113. Acute and subacute toxicity studies of Chitosan reduced gold nanoparticles: a novel carrier for therapeutic agents / V. Pokharkar, S. Dhar, D. Bhumkar, V. Mali et al. Biomed Nanotechnol. – 2009. – Vol.5(3). – P. 233-238.
- 114. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats /W. Hairuo, M. Dan,Y. Yang, J. Lyu et al. // PLoS One. 2017. Vol.12(9). P. e0185554.
- 115. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice / B.
 Wang, W.-Y. Feng, T.-C. Wang, G. Jia et al. // Toxicology Letters. 2006. Vol.161(2). P. 115-123.
- 116. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo / Z. Chen, H. Meng, G. Xing, C. Chen et al. // Toxicol. Lett. 2006. Vol.25. P. 109-120.
- 117. Adjroud O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment / O. Adjroud // Envion. Toxicol. – 2013. – Vol.28(5). – P. 290-298.
- 118. AFM of bacterial cells subjected to different factors / A.M. Lomonosov, S.N. Egorov, M.O. Gallyamov, I.V. Yaminsky // Phys. Low-Dim. Struct. 2003. Vol.3-4. P. 125-130.
- 119. Ahmadi F. Investigation on silver retention in different organs and oxidative stress enzymes in male broiler fed diet supplemented with powder of nano silver / F. Ahmadi, A.H. Kordestany // Amer.-Eurasian J. Toxicol. Sci. 2011. Vol.3 (1). P. 28-35.
 - 120. A multiparametric study of gold nanoparticles cytotoxicity, internalization and permeability using an in vitro model of blood-brain barrier. Influence of size, shape and capping agent / M. Enea, M. Peixoto de Almeida, P. Eaton et al. // Nanotoxicology. – 2019. – V.14. – P.1-15.

- 121. An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated supermagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure / M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani, A.S. Milani et al. //Nanotechnology. 2009. Vol.20. P. 1-8.
- 122. Anolles G. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotides / G. Anolles, B.J. Bassam, P.M. Gresshoff // Biotechnology. – 1991. – Vol. 9 (6). – P. 553.
- 123. Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade /A.R. Rivera, L. Castillo-Pichardo, Y. Gerena et al. // PLoS One. – 2016. – Vol.11(6).
- 124. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo / M. Hashemzaei, A.D. Far, A.Yari, R.E. Heravi et al. // Oncology reports. 2017. Vol.38 (2). P. 819-828.
- 125. Antioxidant and hepatoprotective role of selenium against silver nanoparticles / S.
 Ansar, S.M. Alshehri, M. Abudawood, S.S. Hamed et al. // Int. J. Nanomedicine.
 2017. Vol.24 (12). P. 7789-7797.
- 126. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles / G. Liu,
 J. Gao, H. Ai, X. Chen //Small. 2013. Vol.9 (9-10). P. 1533-1545.
- 127. Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles / H.R. Kim, Y.J. Park, Y. Shin da, S.M. Oh et al. //Environ. healthtoxicology. 2013. Vol.28. e2013003.
- 128. Are in vivo and in vitro assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition of data obtained in some experiments with NiO and Mn₃O₄ nanoparticles / I.A. Minigalieva, T.V. Bushueva, E. Froehlich, C. Meindl et al. //Food and Chemical Toxicology. 2017. Vol.109 (1). P. 393-404.
- 129. Arnhold J. Role of functional groups of human plasma and luminol in scavenging of NaOCl and neutrophil-derived hypochlorous acid / J. Arnhold, S. Hammerschmidt, K. Arnold // Biochem. Biophys. Acta. – 1991. – Vol.1097 (2). – P. 145-151.

- 130. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles / Y-Sh. Chen, Y-Ch. Hung, G.S. Huang // Nanoscale Res. Letters. 2009. Vol.4 (8). P. 858-864.
- 131. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria / E.V. Dubrovin, A.G. Voloshin, S.V. Kraevsky, T.E. Ignatyuk et al. // Langmuir. – 2008. – Vol.24. – P. 13068-13074.
- 132. Atomic force microscopy of the interaction of erythrocyte membrane and virus particles / B.N. Zaitsev, A.G. Durymanov, V.M. Generalov // Proc. Intern. Workshop Scanning Probe Microscopy-2002. Nizhny Novgorod, 2002. 211 p.
- 133. Atomic force microscopy study of fine structures of the entire surface of red blood cells / P.C. Zhang, C. Bai, Y.M. Huang, H. Zhao et al. // Scanning Microsc. – 1995. – Vol. 9(4). – P. 981-989.
- 134. Attenuation of adverse health effects of metallic nanoparticles with innocuous bioprotectors: mechanistic hypotheses and experimental results / I.A. Minigalieva, B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, M.P. Sutunkova et al. // Journal of Clinical Toxicology. 2016. Vol. 6 (6). P. 38.
- 135. Barhoumi L. Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Green Alga Chlorella vulgaris / L. Barhoumi, D. Dewez //BioMed Res. Int. – 2013. – Art. ID 647974. – 11p.
- 136. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice / C. Lasagna-Reeves, D. Gonzalez-Romero, M.A. Barria, I. Olmedo et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – Vol. 393(4). – P. 649-55.
- 137. Bioaccumulation, toxicokinetics, and effects of copper from sediment spiked with aqueous Cu, nano-CuO, or micro-CuO in the deposit-feeding snail, Potamopyrgus antipodarum / C. Pang, H. Selck, G.T. Banta et al. // Environ. Toxicol. Chem. – 2013. – Vol. 32 (7). – P. 1561-73.
- 138. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine /H. Markides, M. Rotherham, A.J.El Haj //J. Nanomaterials. – 2012. – Vol.2012. – Article ID 614094. – 11p.

- 139. Biodistribution and acute toxicity of naked gold nanoparticles in a rabbit hepatic tumor model / E.S. Glazer, C. Zhu, A.N. Hamir et al. // Nanotoxicology. 2011. Vol.5 (4). P. 459-468.
- 140. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats / S.K. Balasurbamanian, J. Jittiwat, J. Manikandan et al. // Biomater. 2010. Vol.31(8). P. 2034-2042.
- 141. Biofabrication of nano copper oxide and its aptamer bioconjugate for delivery of mRNA 29b to lung cancer cells / D. Wu, W. Wang, X. He, M. Jiang et al. //Mater. Sci. Eng. C. Mater Biol Appl. 2019. Vol.97. P. 827-832.
- 142. Biological effects of nano-nickel in rat lungs after administration by inhalation and by intratracheal instillation / A. Ogami, Y. Morimoto, M. Murakami, T. Myojo et al. //Journal of Physics. 2009. Vol.151 (1). P. 1-5.
- 143. Biological prophylaxis of adverse health effects caused by environmental and occupational impacts – theoretical premises, experimental and field testing, practical realization / B. Katsnelson, L. Privalova, S. Kuzmin et al. // Central. Eur. J. Occup. Envir. Med. – 2009. – Vol.15 (1-2). – P. 35-51.
- 144. Biopersistence of inhaled nickel oxide nanoparticles in rat lung / T. Oyabu, A. Ogami, Y. Morimoto, M. Shimada et al. // Inhal. Toxicol. 2007. Vol.19 (1). P. 55-58.
- 145. Biopersistence of NiO and TiO₂ Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Inhalation / T. Oyabu, T. Myojo, B-W. Lee, T. Okada et al. //Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol.18(12). P. 2757.
- 146. Bolshakova A.V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy / A.V. Bolshakova, O.I. Kiselyova, I.V. Yaminsky // Biotechnology Progress. 2004. Vol.20. P. 1615-1622.
- 147. Brain microvessel endothelial cells responses to gold microparticles: in vitro proinflammatory mediators and permeability / W.J. Trickler, S.M. Lantz, R.C. Murdock et al. // Nanotoxicology. – 2011. – Vol.5. – P. 479-492.

- 148. Capasso L. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells / L. Capasso, M. Camatini, M. Gualtieri // Toxicol. Lett. – 2014. – Vol.226(1). – P. 28-34.
- 149. Chen X. Nanosilver: A nanoproduct in medical application / X. Chen, H. Schluesener // J. Toxicol. Lett. 2008. Vol.176. P.1-12.
- 150. Combined Subchronic Toxicity of Aluminum (III), Titanium (IV) and Silicon (IV) Oxide Nanoparticles and Its Alleviation with a Complex of Bioprotectors / I.A. Minigalieva, B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, M.P. Sutunkova et al. //International Journal of Molecular Sciences. 2018. Vol. 19(3), 837. P. 1-28.
- 151. Comparative assessment of the effects of short-term inhalation exposure to Nickel oxide nanoparticles and microdispersed Nickel oxide / N.V. Zaitseva, M.A. Zemlyanova, V.N. Zvezdin, A.A. Dovbysh et al. //Nanotechnologies in Russia. – 2016. – Vol.11 (9-10). – P. 671-677.
- 152. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment / S.P. Singh, M.F. Rahman, U.S. Murty et al. //Toxicol. Appl. Pharmacology. 2013. Vol.266(1). P. 56-66.
- 153. Comparative Study of Genotoxicity of Silver and Gold Nanoparticles Prepared by the Electric Spark Dispersion Method / E. Plotnikov, S. Zhuravkov, A. Gapeyev, V. Plotnikov et al. //J. Appl. Pharmaceut. Science. – 2017. – Vol.7 (07). – P. 035-039.
- 154. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron ferric oxide in rats / M.T. Zhu, W.Y. Feng, B. Wang, T.C. Wang et al. // Toxicology. – 2008. – Vol.247. – P.102-111.
- 155. Comparative toxicity study of Ag, Au, Ag-Au bimetallic nanoparticles on Daphnia magna / T. Li, B. Albee, M. Alemayehu, R. Diaz et al. //Anal. Bioanal. Chem. - 2010. - Vol.398. - P. 689-700.

- 156. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress / S. Naqvi, M. Samim, M.Z. Abdin, F.J. Ahmed et al. // Int. J. Nanomedicine. – 2010. – Vol.5. – P. 983-989.
- 157. Construction of the genetic linkage map using restriction fragment length polymorphism / D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick, R.V. Davis //Amer. J. Hum. Genet. – 1980. – Vol.32. – P. 314.
- 158. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes / H.L. Klarsson, P. Cronholm, J. Gustafsson, L. Möller // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – Vol.21(9). – P. 1726-32.
- 159. Copper toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: effect of vitamin E / R.J. Sokol, M.W. Devereaux, M.G. Traber, R.H. Shikes // Pediatr. Res. 1989. Vol.25(1). P. 55-62.
- 160. Correlation between cytotoxicity and fibrogenicity of silicosis-inducing dusts /
 B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, N.S. Kislitsina, G.A. Podgaiko // Med. Lav. –
 1984. Vol.75. P. 450-462.
- 161. Creutzenberg O. Toxic Effects of Various Modifications of a Nanoparticle Following Inhalation (Research Project F 2246) / O. Creutzenberg, Th. Gebel. Dresden: Federal Institute for Occupational Safety and Health, 2013. 402 p.
- 162. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells / S. Alarifi, D. Ali, A. Verma, S. Alakhtani et al. // Intern. J. Toxicology. – 2013. – Vol. 32(4). – P. 296-307.
- 163. Cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles: an in vitro biosafety study / El. Sonmez, E. Aydin, T. Hasan, E. Özbek et al. // Arch. Biol. Sci. 2016. Vol.68 (1). P. 41-50.
- 164. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells / P.V. Asharani, G. Low Kah Mun, M. Prakash Hande, S. Valiyaveettil et al. // ACS Nano. – 2009. – Vol.3(2). – P. 279-290.
- 165. Cytotoxicity of gold nanoparticles prepared by ultrasonic spray pyrolysis / R. Rudolf, B. Friedtich, S. Stopić et al. // J. Biomaterials Applic. 2012. Vol.26 (5). P. 595-612.

- 166. Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent ells in vitro and in vivo / Y.Y. Kao, T.J. Cheng, D.M. Yang, P.Sh. Liu // J. Molecular Neurosci. 2012. Vol.48(2). P. 464-71.
- 167. Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position rs2735940 in the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene by the Introduction of a New Restriction Enzyme Site for the PCR-RFLP Assay / S. Wang, M. Ding, X. Duan, T. Wang et al. //An. Clin. Lab. Sci. – 2017. – Vol.47 (5). – P. 546-550.
- 168. Development of a multicompartmental model of the kinetics of quartz dust in the pulmonary region of the lung during chronic inhalation exposure of rats / B.A. Katsnelson, L.K. Konysheva, L.I. Privalova, K.I. Morosova // Brit. J. Ind. Med. – 1992. – Vol. 49. – P. 172-181.
- 169. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation / C.L. Auger, P.L. Teissedre, P. Gérain, N. Lequeux et al. // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53 (6). – P. 2015-21.
- 170. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals / Q. Zwang, K. Yukinori, K. Sano, K. Nakakuki et al. // J. Toxicol. Environmental Health. – 1998. – Vol. 53. – P. 423-438.
- 171. Differential distribution and association of FTO rs9939609 gene polymorphism with obesity: A cross-sectional study among two tribal populations of India with East-Asian ancestry / S.S. Ningombam, V. Chhungi, M.K. Newmei, S. Rajkumari et al. //Gene. – 2018. – Vol. 647. – P. 198-204.
- 172. Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials / W. Utembe, K. Potgieter, A.B. Stefaniak, M. Gulumian // Part. Fibre Toxicol. – 2015. – Vol.12. – P. 11.
- 173. Dissolved Organic Matter Modulates Algal Oxidative Stress and Membrane System Responses to Binary Mixtures of Nano-Metal-Oxides (nCeO₂, nMgO and nFe₃O₄) and Sulfadiazine / F. Zhang, N. Ye, S. Wang, Y. Meng et al. // Nanomaterials (Basel). – 2019. – Vol. 9(5). – pii: E712.

- 174. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells / M. Ahamed, M. Karns, M. Goodson et al. // Toxicol. Applied Pharmacology. – 2008. – Vol. 233 (3). – P. 404-410.
- 175. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers
 / I. Williams, A.R. Kubelik, K.I. Livak, I.A. Rafalski et al. // Nucleic. Acids Res.
 1990. Vol.18 (22). P. 6531.
- 176. Dose-dependent benefits of quercetin on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer /J.L. Steiner, J.M. Davis, J.L. McClellan, R.T. Enos et al. // Cancer Biology and Therapy. 2014. Vol.15 (11). P. 1456-1467.
- 177. Dose-dependent genotoxicity of copper oxide nanoparticles stimulated by reactive oxygen species in human lung epithelial cells / M.J. Akhtar, S. Kumar, H.A. Alhadlaq et al. // Toxicol. Ind. Health. 2016. Vol.32 (5). P. 809-821.
- 178. Досыбаева Г.Н. Цитоморфологическая оценка клеток бронхоальвеолярного лаважа, печени и желудка при воздействии хлопковой пыли, содержащей фосфороорганические пестициды в эксперименте / Г.Н. Досыбаева // World Science. International Scientific and Practical Conference. – 2016. – Vol. 3, №5(9). – Р. 22-25.
- 179. Dykman L. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives / L. Dykman, N. Khlebtsov // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41(6). P. 2256-2282.
- 180. Effects of iron oxide nanoparticles on pulmonary morphology, redox system, production of immunoglobulins and chemokines in rats: in vivo and in vitro studies / B. Szalay, Z. Kováciková, M. Brózik, M. Pándics et al. // CEJOEM. 2008. Vol.14 (2). P. 149-164.
- 181. Elbialy N.S. Long-term biodistribution and toxicity of curcumin capped iron oxide nanoparticles after single-dose administration in mice / N.S. Elbialy, S.F. Aboushoushah, W.W. Alshammari // Life Sciences. – 2019. – Vol. 230. – P. 76-83.

- 182. Ellman G. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups / G. Ellman, H. Lysko // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 93(l). – P. 98-102.
- 183. Erythropoietin-mediated erythrocytosis in rodents after intrarenal injection of nickel subsulfide / F.W. Sunderman, Jr. M. Hopfer, M.C. Reid, S.K. Shen et al. // Yale J. Biol. Med. – 1982. – Vol. 55(2). – P. 123-136.
- 184. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) in vitro and in vivo / P. Tavares, F. Balbinot, H. Martins de Oliveira et al. // J. Nanoparticle Research. – 2012. – Vol.14. – P. 791.
- 185. Exposure to inhalable, respirable, and ultrafine particles in welding fume / M. Lehnert, B. Pesch, A. Lotz, J.Pelzer et al. //Ann. Occup. Hyg. 2012. Vol. 56(5). P. 557-567.
- 186. Fadeel B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system /B. Fadeel // Swiss Med. Wkly. – 2012. – Vol.142. – P.
- 187. Feichtenhofer S. Ceruloplasmin as low-density lipoprotein oxidase: activation by ascorbate and dehydroascorbate / S. Feichtenhofer, J.S. Fabjan, P.M. Abuja // FEBS Letter. – 2001. – Vol. 501(1). – P. 42-46.
- 188. Foldbjerg R. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549 / R. Foldbjerg, D.A. Dang, H. Autrup // Arch. Toxicol. - 2011. - Vol.85. - P. 743-750.
- 189. Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System / F. Barbero, L. Russo, M. Vitali, J. Piella et al. //Semin Immunol. – 2017. –Vol.34. – P. 52-56.
- 190. Fröhlich E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of nonbiodegradable engineered nanoparticles / E. Fröhlich // Curr. Drug. Metab. – 2013. – Vol.14 (9). – P. 976-88.
- 191. Gallyas F. Chemical nature of the first products (nuclei) of the argyrophil stainig / F. Gallyas //Acta Histochemica. –1980. Vol. 67(2). P.145-146.

- 192. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel Mytilus galloprovincialis / T. Gomes, O. Araújo, R. Pereira, A.C. Almeida et al. // J. Mar. Environ. Res. – 2013. – Vol.84. – P. 51-59.
- 193. Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure / N. Dumala, B. Mangalampalli, S. Chinde, S.I. Kumari // Mutagenesis. – 2017. – Vol.32(4). – P. 417-427.
- 194. Glucose accelerates copper- and ceruloplasmin-induced oxidation of low-density lipoprotein and whole serum / V. Leoni, R. Albertini, A. Passi, P.M. Abuja et al. // Free Radic. Res. – 2002. – Vol. 36. – P. 521-529.
- 195. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage / Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau et al. // Small. – 2009. – Vol. 5(18). – P. 2067-2076.
- 196. Hematite nanoparticles larger than 90 nm show no sign of toxicity in terms of lactate dehydrogenase release, nitric oxide generation, apoptosis, and comet assay in murine alveolar macrophages and human lung epithelial cells / F.S. Freyria, B. Bonelli, M. Tomatis, M. Ghiazza et al. //Chem. Res. Toxicol. 2012. Vol. 25(4). P. 850-861.
- 197. Hendrickson H.S. Comparison of the metal-binding properties of nitrilotri(methylenephosphonic) acid and nitrilotriacetic acid: calcium(II), nickel (II), iron (III), and thorium (IV) complexes / H.S. Hendrickson // Analytical Chemistry. 1967. Vol. 39 (8). P. 998-1000.
- 198. Ho V.T. Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein / V.T. Ho, H.F. Bunn // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 223. – P. 175-180.
- 199. Homocysteine promotes the LDL oxidase activity of ceruloplasmin /M. Exner,
 M. Hermann, R. Hofbauer, B. Hartmann et al. // FEBS Lett. 2002. Vol.531. –
 P. 402-406.
- 200. Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection //Ann. ICRP. 1994. Vol. 24(1-3). P. 1-482.

- 201. Impact of gold nanoparticle concentration on their cellular uptake by MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells as analyzed by transmission electron microscopy / T. Mustafa, F. Watanabe, W. Monroe et al. // J. Nanomedic. Nanotechnol. 2011. Vol. 2. P. 1-8.
- 202. Improved method to disperse nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* investigation of toxicity / T.M. Sager, D.W. Porter, V.A. Robinson, W.G. Lindsley et al. // Nanotoxicology. – 2007. – Vol.1. – P. 118-129.
- 203. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants / K.K. Panda, V.M. Achary, R. Krishnaveni et al. // Toxicol. in Vitro. – 2011. – Vol. 25(5). – P. 1097-1105.
- 204. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish / J.E. Choi, S. Kim, J.H. Ahn et al. // Aquatic Toxicology. 2010.
 Vol.100 (2). P. 151-159.
- 205. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm / V.H. Grassian, P.T. O'Shaughnessy, A. Adamcakova-Dodd, J.M. Pettibone et al. //Environ. Health Perspect. 2007. Vol.115. P. 397-402.
- 206. Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice / T. Stoeger, C. Reinhard, Sh. Takenaka, A. Schroeppel et al. // Environ. Health Perspect. – 2006. – Vol.114(3). – P. 328-333.
- 207. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells
 / S. Arora, J. Jain, J.M. Rajwade, K.M. Paknikar // Toxicol. applied
 Pharmacology. 2009. Vol. 236. P. 310-318.
- 208. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions / M. Cuillel, M. Chevallet, P. Charbonnier et al. // Nanoscale. – 2014. – Vol.16 (3). – P. 1707-15.
- 209. Interference of silver, gold, and iron oxide nanoparticles on epidermal growth factor signal transduction in epithelial cells / K.K. Comfort, E.I. Maurer, L.K.

Braydich-Stoll, S.M. Hussain // ACS Nano. – 2011. – Vol.5(12). – P. 10000-10008.

- 210. International guiding principles for biomedical research involving animals. Geneva, 1985. 28 p.
- 211. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions / P. Cronholm, H.L. Karlsson, J. Hedberg et al. // Small. – 2013. – Vol.8 (9). – P. 970-82.
- 212. Investigating the toxic effects of iron oxide nanoparticles / S.J. Soenen, M. De Cuyper, S.C. De Smedt, K. Braeckmans //Methods Enzymol. 2012. Vol. 509. P. 195-224.
- 213. Jomova K. Thermodynamics of Free Radical Reactions and the Redox Environment of a Cell / K. Jomova, M. Valko // Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy. – Washington, DC: American Chemical Society, 2011. – P. 71-118.
- 214. Jugan M.L. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology / M.L. Jugan,
 Y. Levi, J.P. Blondeau // Biochem. Pharmacol. 2010. Vol. 79(7). P. 939-947.
- 215. Kadi I.E. Vitamin C pretreatment protects from nickel-induced acute nephrotoxicity in mice / I.E. Kadi, F. Dahdouh // Arh. Hig. Rada Toksikol. – 2016. – Vol.67(3). – P. 210-215.
- 216. Katsnelson B.A. Recruitment of phagocytizing cells into the respiratory tract as a response to the cytotoxic action of deposited particles / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova // Environm. Health Per. 1984. Vol. 55. P. 313-325.
- 217. Kilburn K.H. Alveolar clearance of particles. A bullfrog lung model / K.H. Kilburn //Arch. Environm. Health. 1996. Vol. 18. P. 556-563.
- 218. Kim J. Differentiation of toxicities of silver nanoparticles and silver ions on the Japanese medaka (Oryzias latipes) and the cladoceran Daphnia magna / J. Kim, S. Kim, S. Lee // Nanotoxicology. – 2011. – Vol.5. – P. 208-214.

- 219. Kinetics of monosodium glutamate in human volunteers under different experimental conditions / P. Ghezzi, M. Bianchi, L. Gianera, M. Salmona // Food and Chem. Toxicol. – 1985. – Vol. 23 (11). – P. 975-978.
- 220. Kolanjiyil A.V. Deposited nanomaterial mass transfer from lung airways to systemic regions / A.V. Kolanjiyil: hesis submitted to the Graduate Faculty ofNorth Carolina State Universityin partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. – Raleigh, North Carolina, 2013. – 248 p.
- 221. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression / A. Canbay, A.E. Feldstein, H. Higuchi, N. Werneburg et al. // Hepatology. – 2003. – Vol.38. – P. 1188-11.
- 222. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism / E.
 Sadauskas, H. Wallin, M. Stoltenberg, U. Vogel et al. // Part Fibre Toxicol. –
 2007. Vol.4 (10). P. 10.
- 223. Lewinski N. Human inhalation exposure to iron oxide particles / N. Lewinski, H. Graczyk, M. Riediker // BioNanoMat. 2013. Vol. 14(1-2). P. 5-23.
- 224. Li N. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles / N. Li, T. Xia, A.E. Nel // Free Rad. Biol. Med. 2008. Vol.44. P. 1689-1699.
- 225. Liao M. Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral administration / M. Liao, H. Liu // Environ. Toxicol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 34 (1). – P. 67-80.
- 226. Linking hydrophilic macromolecules to monodisperse magnetite (Fe₃O₄) nanoparticled via trichloro-S-triazine / J. Xie, Ch. Xu, Y. Hou, K.L. Young et al. // Chem. Mater. 2006. Vol. 18. P. 5401-5403.
- 227. Lung clearance and retention of toner, utilizing a tracer technique, during chronic inhalation exposure in rats / B. Bellmann, H. Muhle, O. Creutzenberg, C. Dasenbrock // Fundam. Appl. Toxicol. 1991. Vol.17. P. 300-313.
- 228. Magaye R. Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles' genotoxicity and carcinogenicity / R. Magaye, J. Zhao // Environ. Toxicol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 34(3). – P. 644-650.

- 229. Magnetic nanoparticles: generating methods, structure, and properties / S.P. Gubin, Yu.A. Koksharov, G.B. Homutov, G.Yu. Yurkov et al. //Uspekhi Chimii. 2005. Vol. 74. P. 539-574.
- 230. Management of nanomaterials safety in research environment / A. Grosco, A. Petri-Fink, A. Magrez et al. //Particles and Fibers Toxicol. 2010. Vol.7. P. 40.
- 231. Maulderly J.L. Particle overload in the rat lung and lung cancer, Implications for human risk assessment / J.L. Maulderly, R.G. McCunney. – USA Taylor & Francis, Philadelphia, 1997. – 20 p.
- 232. Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice / M.F. Song, Y.S. Li, H. Kasai, K. Kawai //J. Clin. Biochemistry and Nutrition. 2012. Vol. 50(3). P. 211-216.
- 233. Mukhopadhyay C.K. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency / C.K. Mukhopadhyay, B. Mazumder, P.L. Fox // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 21048-21054.
- 234. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay / X. Pan, J.E. Redding, P.A. Wiley, L. Wen // Chemosphere. – 2010. – Vol.79, Is.1. – P. 113-6.
- 235. Nano copper induced apoptosis in podocytes via increasing oxidative stress / P. Xu, J. Xu, S. Liu, Z. Yang // J. Hazard. Mater. 2012. Vol.30 (241-242). P. 279-286.
- 236. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles / L.K. Limbach, A.M. Studer, L. Van Duc, et al. // Toxicol. Lett. 2010. Vol. 1 (197). P. 169-74.
- 237. Nanoparticle delivery in infant lungs / M. Semmler-Behnke, W.G. Kreyling, H. Schulz, S. Takenaka et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. –Vol.109(13). P. 5092-5097.
- 238. Nanoparticle-allergen interactions mediate human allergic responses: protein corona characterization and cellular responses / I. Radauer-Preiml, A. Andosch,

T. Hawranek, U. Luetz-Meindl et al. // Part Fibre Toxicol. – 2016. – Vol.13. – P.
3.

- 239. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation modsel / L.V. Stebounova, A. Adamcakova-Dodd, J.S. Kim // Particles & Fibers Toxicol. 2011. Vol. 8(1). P. 1-12.
- 240. Nanotoxicity and spectroscopy studies of silver nanoparticle: calf thymus DNA and k562 as targets / M. Rahban, A. Divsalar, A.A. Saboury, A. Golestani // J. Phys. Chem. – 2010. – Vol.114(13). – P. 7.
- 241. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons /T.R.
 Pisanic 2nd, J.D. Blackwell, V.I. Shubayev et al. // Biomaterials. –2007. Vol. 28 (16). P. 2572-2581.
- 242. Nanotoxicology / K. Donaldson, V. Stone, C.K. Tran, W. Kreyling et al. //Occup. Environ. Med. – 2004. – Vol.61. – P. 727-728.
- 243. Neuberger M. Umweltepidemiologie und Toxikologie von Nanopartikeln /M. Neuberger // Nano-Chancen und Risiken aktueller Technologien. – Wien-New York: Springer, 2007. – P. 181-197.
- 244. Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin / S. Lee, S-H. Hwang, J. Jeong, Y. Han et al. //Part Fibre Toxicol. 2016. Vol.13. P. 30.
- 245. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary fibrosis via TGF-β1 activation in rats / X.H. Chang, A. Zhu, F.F. Liu, L.Y. Zou et al. //Human. Experimental Toxicology. – 2016. – Vol.36 (8). – P. 802-812.
- 246. Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles / S. Latvala, J. Hedberg, S. Di Bucchianico, L. Möller et al. // PLoS One. – 2016. – Vol.11 (7). – e0159684.
- 247. NMR-based metabonomic study of the sub-acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after oral administration / Q. Bu, G. Yan, P. Deng, F. Peng et al. //Nanotechnology. – 2010. – Vol.21 (2). – P. 105-125.

- 248. Oberdörster G. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studied of ultrafine particles / G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster //Environ. Health Persp. – 2005. – Vol. 113. – P. 823-839.
- 249. On the relationship between activation and the breakdown of macrophages in pathogenesis of silicosis / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, N.Ye. Sharapova, N.S. Kislitsina // Medic Lavoro. – 1995. – Vol. 86(6). – P. 511-521.
- 250. Particle size distribution of welding fume and its dependency on conditions of shielded metal arc welding / A.A. Ennan, S.A. Kiro, M.V. Oprya, V.I. Vishnyakov // J. Aerosol Sci. – 2013. – Vol.65. – P. 103-110.
- 251. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) / N. Singh, G.J.S. Jenkins, R. Asadi, S.H. Doak // Nano Rev. – 2010. – Vol.1. – P. 5358.
- 252. Prediction of the comparative intensity of pneumoconiotic changes caused by chronic inhalation exposure to dusts of different cytotoxicity by means of a mathematical model / B.A. Katsnelson, L.K. Konyscheva, N.Ye. Sharapova, L.I. Privalova // Occup. Environm. Med. – 1994. – Vol. 51. – P. 173-180.
- 253. Privalova L.I. Some peculiarities of the pulmonary phagocytotic response, dust kinetics, and silicosis development during long term exposure of rats to high quartz levels / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, L.N. Yelnichnykh // Brit. J. Ind. Med. – 1987. – Vol. 44. – P. 228-235.
- 254. Proinflammogenic Effects of Low-Toxicity and Metal Nanoparticles In Vivo and In Vitro: Highlighting the Role of Particle Surface Area and Surface Reactivity / R. Duffin, L. Tran, D. Brown, V. Stone et al. // Inhal. Toxicol. – 2007. – Vol.19(10). – P. 849-56.
- 255. Protective effect of L-ascorbic acid on nickel induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats / S.H. Hattiwale, S. Saha, S.M. Yendigeri, J.G. Jargar et al. // Biometals. – 2013. – Vol. 26(2). – P. 329-36.
- 256. Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? / F. Pederzoli, G. Tosi, M.A. Vandelli, D. Belletti et al. // Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomed. Nanobiotechnol. 2017. Vol. 9(6). e1467.

- 257. Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells / N.V. Konduru, R.M. Molina, A. Swami, F. Damiani et al. // Part Fibre Toxicol. 2017. Vol. 14(1). P. 42.
- 258. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics / D.B. Warheit, T.R. Webb, V.L. Colvin, K.L. Reed // Toxicol Sci. – 2007. – Vol.95. – P. 270-280.
- 259. Pulmonary response after exposure to inhaled nickel hydroxide nanoparticles: short and long-term studies in mice / P.A. Gillespie, G.S. Kang, A. Elder, R. Gelein et al. // Nanotoxicology. – 2010. – Vol.4(1). – P. 106-119.
- 260. Pulmonary toxicity and kinetic study of Cy5,5-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles by optical imaging / W.S. Choi, M. Cho, S.R. Kim, J.Y. Lee et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – Vol.239. – P. 106-115.
- 261. Quartz dust retention in rat lungs under chronic exposure simulated by a multicompartmental model: Further evidence of the key role of the cytotoxicity of quartz particles / B.A. Katsnelson, L.K. Konysheva L.Y. Privalova, N.Y. Sharapova //Inhalat. Toxicol. – 1997. – Vol.9. – P. 703-715.
- 262. Ranganathan S. Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells / S. Ranganathan, D. Halagowder, N.D. Sivasithambaram //PLoS One. – 2015. – № 10(10).
- 263. Reactivity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological media / N.G. Bastus, E. Casals, V.C. Socorro, V. Puntes // Nanotoxicology. – 2008. – Vol.2(3). – P. 99-112.
- 264. Regulatory approaches to worker protection in nanotechnology industry in the USA and European Union / V. Murashov, P. Shulte, C. Geraci, J. Howard // Industr. Health. – 2011. – Vol.49. – P. 280-296.
- 265. Renwick L. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types / L. Renwick, Br. K. Clouter, K. Donaldson // Occupat. Environm. Med. – 2004. – Vol.61. – P. 442-447.

- 266. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nano-particles / E-J. Park, E. Bae, Y.Yi et al. // Environm. Toxicol. and Pharmacol. – 2010. – Vol.30 (2). – P. 162-168.
- 267. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, A.B. Osipenko, B.H. Yushkov et al. // Environm. Health Perspect. 1980. Vol. 3(5). P. 205-218.
- 268. Role of the Nrf2-heme oxygenase-1 pathway in silver nanoparticle mediated cytotoxicity / S.J. Kang, I.G. Ryoo, Y.J. Lee, M.K. Kwak // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2012. – Vol.258 (1). – P. 89-98.
- 269. Rutin, a Flavonoid and Principal Component of Saussurea Involucrata, Attenuates Physical Fatigue in a Forced Swimming Mouse Model /K.-Yi Su, Ch.Y. Yu, Yu.-W. Chen, Yi-T. Huang et al. // International Journal of Medical Sciences. – 2014. – Vol.11(5). – P. 528-537.
- 270. Sharifiyazdi H. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows / H. Sharifiyazdi, A. Mirzaei, Z. Ghanaatian // Anim. Reprod. Sci. – 2018. – Vol.188. – P. 45-50.
- 271. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain micro vessel endothelial cells / W.J. Trickler, S.M. Lantz, R.C. Murdock et al. // Toxicol. Sci. – 2010. – Vol.118. – P.160-170.
- 272. Size-dependent toxicity of metal oxide particles a comparison between nanoand micrometer size / H.L. Karlsson, J. Gustafsson, P. Cronholm, L. Möller //Toxicol Lett. – 2009. – Vol.88(2). – P. 112-8.
- 273. Some patterns of metallic nanoparticles' combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles / B.A. Katsnelson, I.A. Minigaliyeva, L.I. Privalova, V.B. Gurvich et al. // Food and Chemical Toxicology. 2015. Vol. 86. P. 351-364.

- 274. Sotiriou G.A. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles / G.A. Sotiriou, S.E. Pratsinis // Environm. Sci. and Technology. 2010. Vol.44 (14). P. 5649-5654.
- 275. Sousa C.A. Toxic effects of nickel oxide (NiO) nanoparticles on the freshwater alga Pseudokirchneriella subcapitata / C.A. Sousa, H.M. Soares, E.V. Soares //Aquat. Toxicol. – 2018. – Vol.204. – P. 80-90.
- 276. Srivastava M. Exposure to silver nanoparticles inhibits selenoprotein synthesis and the activity of thioredoxin reductase / M. Srivastava, S. Singh, W.T. Self // Environ. Health. Perspect. – 2011. – Vol.120. – P. 56-61.
- 277. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action / O. Bondarenko, A. Ivask, A. Käkinen, A. Kahru // Environ. Pollut. – 2012. –Vol.169. – P. 81-89.
- 278. Tailoring Cell Morphomechanical Perturbations Through Metal Oxide Nanoparticles / V. De Matteis, M. Cascione, C.C. Toma, P. Pellegrino et al. //Nanoscale Res. Lett. – 2019. – Vol.14(1). – P.109.
- 279. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles / M.V. Park, A.M. Neigh, J.P. Vermeulen et al. // Biomaterials. 2011. Vol.32(36). P. 9810-9817.
- 280. The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles / J. Liu, X. Feng, L. Wei, L. Chen et al. //Crit. Rev. Toxicol. 2016. Vol. 46(4). P. 348-384.
- 281. Theodorou I.G. Effect of pulmonary surfactant on the dissolution, stability and uptake of zinc oxide nanowires by human respiratory epithelial cells / I.G Theodorou, P. Ruenraroengsak // Nanotoxicology. – 2016. – Vol. 21. – P 1-37.
- 282. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells / K. Bhattacharya, M. Davoren, J. Boertz, R.P. Schins et al. //Part. Fibre Toxicol. 2009. Vol. 6. P. 17.
- 283. Tiwari D.K. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats // Toxicology mechanisms and methods / D.K. Tiwari, T. Jin, J. Behari 2011. – Vol. 21(1). – P. 13-24.

- 284. Tkeshelashvili L. Effect of some nickel compounds on erythrocyte characteristics
 / L. Tkeshelashvili, K. Tsakadze, O. Khulusauri //Biol. Trace Elem. Res. 1989.
 Vol. 21 (1). P. 337-342.
- 285. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein / W.U. Xinying, T. Yanbin, M. Hui, M. Zhang. 2010. Vol.5. P. 385-399.
- 286. Toxicity and Biokinetics of Colloidal Gold Nanoparticles / M.R. Jo, S.H. Bae, M.R Go, H.J. Kim // Nanomaterials (Basel). – 2015. – Vol.5(2). – P. 835-850.
- 287. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models / A. Adamcakova-Dod, L.V. Stebounova, J.S. Kim, S.U. Vorrink et al. // Part. Fibre Toxicology. – 2014. – Vol.11. – P. 15.
- 288. Toxicity of Engineered Nickel Oxide and Cobalt Oxide Nanoparticles to Artemia salina in Seawater / M. Ates, V. Demir, Z. Arslan, M. Camas et al. //Water, Air, Soil Pollution. – 2016. – Vol.227. – P. 70-78.
- 289. Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? / C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, H. Autrup et al. // Toxicol. Letters. 2012. Vol.208 (3). P. 286-292.
- 290. Toxicological assessment of orally delivered nanoparticulate insulin. / C.P. Reis,
 I.V. Figueiredo, R.A. Carvalho, J. Jones et al. //Nanotoxicology. 2008. Vol.2.
 P. 205-217.
- 291. Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats / L.E. Yu, L.-Y.L. Yung, C.-N. Ong, Y.-L. Tan et al. //Nanotoxicology. – 2007. – Vol. 1(3). – P. 235- 242.
- 292. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System / A. Elder, R. Gelein, V. Silva, T. Feikert et al. // Environ. Health Perspect. – 2006. – Vol.114(8). – P. 1172-1178.
- 293. Translocation of inhaled ultrafine particle to the brain / G. Oberdörster, Z. Sharp,
 V. Atudore, A. Elder et al. // Inhal. Toxicol. 2004. Vol.16 (6/7). P. 437-445.
- 294. Twenty-eight day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Spraque-Dawley rats / Y.S. Kim, J.S. Kim, H.S. Cho et al. // Inhal. Toxicol. – 2008. – Vol.20. – P. 575-583.

- 295. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats / J.J. Ho, J.J. Hee, K.S. Soo, Y. Jin-Uk et al. // Inhalat. Toxicol. – 2007. – Vol.19(10). – P. 857-871.
- 296. Ultra small c(RgDyK)-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their specific targeting to integrin α_vβ₃-rich tumor cells / J. Xie, K. Chen, H.-Y. Lee, Ch. Xu et al. //J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol.130. P. 7452-7453.
- 297. Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators / Q. Zhang, V.M. Hitchins, A.M. Schrand et al. //Nanotoxicology. – 2011. – Vol.5. – P. 284-295.
- 298. Vitamin D alleviates lead induced renal and testicular injuries by immunomodulatory and antioxidant mechanisms in rats / M.A. BaSalamah, A.H. Abdelghany, M. El-Boshy et al. // Sci. Rep. – 2018. – Vol.8(1). – P. 4853.
- 299. Wallace R.B. DNA recombinant technology / R.B. Wallace. Boca Raton (Fla.): CRC press, 1983. – 212 p.
- 300. Waugh R. Using RAPD marker for crop improvement / R. Waugh, W. Powell //Trends Biotechnol. 1992. Vol.10. P.186.
- 301. Welsh J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh, M. McClelland // Nucleic Acids Res. 1990. Vol.18 (24). P. 7213.
- 302. Yokel R.A. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention / R.A. Yokel, R.C. MacPhail // J. Occup. Med. Toxicol. – 2011. – №6. – Р. 7.
- 303. Zn (II) released from zinc oxide nano/micro particles suppresses vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells / S. Tada-Oikawa, G. Ichihara, Y. Suzuki, K. Izuoka et al. //Toxicol. Rep. – 2015. – Vol.2. – P. 692-701.