



Панов В.Г.^{1,2}, Минигалиева И.А.¹, Бушуева Т.В.¹, Артёменко Е.П.¹, Рябова Ю.В.¹,
Сутункова М.П.¹, Гурвич В.Б.¹, Привалова Л.И.¹, Кацнельсон Б.А.¹

Различные варианты дозозависимого эффекта наночастиц оксида селена и оксида меди *in vitro* и применение парадигмы гормезиса

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий», 620014, Екатеринбург, Россия;

²ФГБУН «Институт промышленной экологии Уральского отделения Российской академии наук», 620219, Екатеринбург, Россия

Введение. В исследованиях *in vitro* на культуре кардиомиоцитов было показано, что зависимости доза-эффект могут быть монотонными для одних эффектов и немонотонными для других. В данной работе мы хотели продемонстрировать, что указанные особенности зависимости доза-эффект являются общей закономерностью.

Материалы и методы. Были проведены эксперименты *in vitro* на культуре человеческих фибробластоподобных клеток ФЛЭЧ-104. Исследовали цитотоксичность сферических наночастиц оксида селена (SeO-NЧ) со средним диаметром 51 ± 14 нм и оксида меди (CuO-NЧ) со средним диаметром 21 ± 4 нм.

Результаты. SeO-NЧ и CuO-NЧ оказывают цитотоксический эффект на человеческие фибробластоподобные клетки, о чём свидетельствует снижение АТФ-зависимой люминесценции. При этом цитотоксический эффект CuO-NЧ несколько сильнее по сравнению с SeO-NЧ. Наш эксперимент выявил дозы, вызывающие как гипертрофию клеток, так и уменьшение размеров клеток и ядер.

Обсуждение. Мы наблюдали как монотонную, так и различные варианты немонотонной зависимости доза-эффект для исследуемых наночастиц. Для немонотонной зависимости нам удалось построить адекватные математические выражения на основе обобщённой парадигмы гормезиса, которую мы рассматривали ранее в отношении цитотоксичности CdS-NЧ и PbS-NЧ для кардиомиоцитов.

Заключение. Варибельность типов зависимости доза-эффект, проявляющаяся в различных эффектах цитотоксичности наночастиц, вероятно, является общим правилом.

Ключевые слова: наночастицы; SeO; CuO; доза-эффект; гормезис

Для цитирования: Панов В.Г., Минигалиева И.А., Бушуева Т.В., Артёменко Е.П., Рябова Ю.В., Сутункова М.П., Гурвич В.Б., Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А. Различные варианты дозозависимого эффекта наночастиц оксида селена и оксида меди *in vitro* и применение парадигмы гормезиса. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(12): 1475-1480. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1475-1480>

Для корреспонденции: Минигалиева Ильзира Амировна, доктор биол. наук, зав. отд. токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: ilzira-minigalieva@yandex.ru

Участие авторов: Панов В.Г. – статистическая обработка, написание текста; Минигалиева И.А. – сбор данных литературы, написание текста, редактирование; Бушуева Т.В. – написание текста; Артёменко Е.П. – сбор данных литературы, сбор и обработка материала; Рябова Ю.В. – сбор данных литературы, сбор и обработка материала; Сутункова М.П. – концепция и дизайн исследования; Гурвич В.Б. – концепция и дизайн исследования; Привалова Л.И. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Кацнельсон Б.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Заключение комитета по биомедицинской этике: Местный комитет по этике Екатеринбургского медицинского исследовательского центра профилактики и охраны здоровья промышленных работников, Российское агентство по защите прав потребителей, протокол № 2 от 20.04.2021 г.

Поступила: 10.11.2021 / Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликована: 30.12.2021

Vladimir G. Panov^{1,2}, Ilzira A. Minigalieva¹, Tatyana V. Bushueva¹, Elizaveta P. Artemenko¹,
Iuliia V. Ryabova¹, Marina P. Sutunkova¹, Vladimir B. Gurvich¹, Larisa I. Privalova¹,
Boris A. Katsnelson¹

The various dose-dependent effect of selenium oxide and copper oxide nanoparticles *in vitro* and application of the hormesis paradigm

¹Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation;

²Institute of Industrial Ecology, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620219, Russian Federation

Introduction. *In vitro* studies on a culture of cardiomyocytes have shown that dose-response relationships could be monotonic for some effects and non-monotonic for others. In this work, we wanted to demonstrate that these features of the dose-response relationship are a general pattern.

Materials and methods. *In vitro* experiments were conducted on the culture of human fibroblast-like cells FLECH-104. The cytotoxicity of spherical nanoparticles of selenium oxide (SeO-NP) and copper oxide (CuO-NP) was studied with an average diameter of 51 ± 14 nm and 21 ± 4 nm, respectively.

Results. SeO-NP and CuO-NP were cytotoxic for human fibroblast-like cells, as judged by a decrease in ATP-dependent luminescence. In this case, the cytotoxicity of CuO-NP was somewhat more substantial than the SeO-NP one. Our experiment revealed doses that cause both cell hypertrophy and a decrease in the size of cells and nuclei.

Discussion. We observed both monotonic and different variants of the non-monotonic dose-response relationship. For the latter, it was possible to construct adequate mathematical expressions based on the generalized hormesis paradigm that we had considered earlier concerning the CdS-NP and PbS-NP cytotoxicity for cardiomyocytes.

Conclusion. The general rule is the variability of the dose-response dependence types manifested in different cytotoxic effects of nanoparticles.

Keywords: nanoparticles; SeO; CuO; dose-response relationships; hormesis

For citation: Panov V.G., Minigalieva I.A., Bushueva T.V., Artemenko E.P., Ryabova Iu.V., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Privalova L.I., Katsnelson B.A. The various dose-dependent effect of selenium oxide and copper oxide nanoparticles in vitro and application of the hormesis paradigm. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2021; 100(12): 1475-1480. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1475-1480> (In Russ.)

For correspondence: Ilzira A. Minigalieva, PhD, Doctor of Biol. Sci., Head of the Department of Toxicology and Bioprophylaxis, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: ilzira-minigalieva@yandex.ru

Information about the authors:

Panov V.G., https://orcid.org/0000-0001-6718-3217	Ryabova Iu.V., https://orcid.org/0000-0003-2677-0479
Minigalieva I.A., https://orcid.org/0000-0002-0097-7845	Sutunkova M.P., https://orcid.org/0000-0002-1743-7642
Bushueva T.V., https://orcid.org/0000-0002-5872-2001	Gurvich V.B., https://orcid.org/0000-0002-6475-7753
Artemenko E.P., https://orcid.org/0000-0003-0125-0063	Privalova L.I., https://orcid.org/0000-0002-1442-6737
Katsnelson B.A., https://orcid.org/0000-0001-8750-9624	

Contribution: Panov V.G. – statistical and mathematical processing, writing a text. Minigalieva I.A. – collection of literature data, writing a text, editing. Bushueva T.V. – writing a text. Artemenko E.P. – collection of literature data, collection and processing of material. Ryabova Iu.V. – collection of literature data, collection and processing of material. Sutunkova M.P. – the concept and design of the study. Gurvich V.B. – the concept and design of the study. Privalova L.I. – the concept and design of the study, editing. Katsnelson B.A. – the concept and design of the study, editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

The conclusion of the committee on biomedical ethics: the Local Ethics Committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Russian Agency for Consumer Rights Protection, protocol number 2 of 20.04.21.

Received: November 10, 2021 / Accepted: November, 2021 / Published: December 30, 2021

Введение

Ранее было продемонстрировано [1], что зависимости доза-эффект в исследованиях цитотоксичности PbS-НЧ или CdS-НЧ в культуре кардиомиоцитов могут быть монотонными для одних эффектов и немонотонными для других. Первое означает, что по мере усиления воздействия эффект усиливается или ослабевает во всём диапазоне доз. В отношениях второго типа направление воздействия меняется по крайней мере дважды с ростом дозы, и его можно назвать гормезисом, в более широком смысле подробно рассмотренным в [2, 3].

Цель статьи – продемонстрировать, что указанные выше особенности зависимости доза-эффект не являются частным случаем, который справедлив только для указанных выше видов наночастиц и типов клеток. С этой целью мы проанализировали результаты экспериментов на культуре фибробластоподобных клеток, подвергнутых воздействию наночастиц оксида селена (SeO-НЧ) или оксида меди (CuO-НЧ).

Материалы и методы

Суспензии наночастиц (НЧ) были приготовлены путём лазерной абляции мишеней CuO и SeO чистотой 99,9% в деионизированной воде. В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Merlin (Carl Zeiss, Германия) было обнаружено, что НЧ обоих типов имеют форму, близкую к сферической (рис. 1). Функции распределения по размерам были получены путём статистического анализа изображений нескольких сотен соответствующих НЧ. Средний диаметр составлял 51 ± 14 нм для SeO-НЧ и 21 ± 4 нм для CuO-НЧ (см. рис. 1). Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, выполненная в сочетании с СЭМ, показала, что химический состав наночастиц в точности соответствует SeO-НЧ и CuO-НЧ.

Отсутствие каких-либо заметных изменений дзета-потенциала, а также формы и положения пика плазменного резонанса через 2 нед после приготовления суспензии подтвердило удовлетворительную стабильность суспензий.

Эксперимент выполнен на линии ФЛЭЧ-104 производства ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, Россия), которая представляет собой монослойную культуру фибробластоподобных клеток, полученных из лёгких 8-недельного

эмбриона человека. Культуру клеток поддерживали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в питательной среде DMEM, содержащей L-глутамин, 1 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,5% гентамицина. Для оценки цитотоксичности НЧ клетки высевали в 96-луночный планшет (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland), 70 000 клеток на лунку в 100 мкл среды, и инкубировали в стандартных условиях в течение 48 ч до получения монослоя. Затем в лунки добавляли суспензии наночастиц CuO и SeO и инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях перед проведением анализа АТФ. Конечная концентрация каждого типа НЧ в среде составляла 25–50–100 мкг/мл.

Для количественной оценки цитотоксических эффектов исследуемыми видами наночастиц в используемых концентрациях мы определили содержание АТФ в культуре по люминесцентному сигналу и измерили размер клетки и ядра клетки. Анализ биолюминесценции АТФ проводили с использованием реагентов Cell Titer-Glo (Promega Corporation, США). Рабочий раствор получали восстановлением лиофилизированного субстрата Cell Titer-Glo в буфере Cell Titer-Glo и нагревали до комнатной температуры на водяной бане. Порцию этого раствора по 100 мкл добавляли в каждую лунку, а затем планшет вращали в одной плоскости в течение 2 мин, чтобы вызвать лизис клеток. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре измеряли люминесценцию клеток с помощью люминометра LM-01T с программным обеспечением Kilia (Immunotech, Beckman Coulter Company, Прага, Чешская Республика). Результаты измерений были представлены в относительных единицах люминесценции (RLU).

Для измерения размера клеток их удаляли с планшета и переносили на предметное стекло для проведения морфометрии под оптическим микроскопом 3D Cell Explorer (Nanolive, Швейцария). Измерения площади клетки и ядра клетки в мкм² проводили в профессиональной программе обработки изображений ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, США).

Для определения типа зависимости доза-реакция экспериментальные данные для конкретного показателя результата были аппроксимированы соответствующим функциональным выражением. Однако выбор аппроксимирующих функций не определялся однозначно даже в

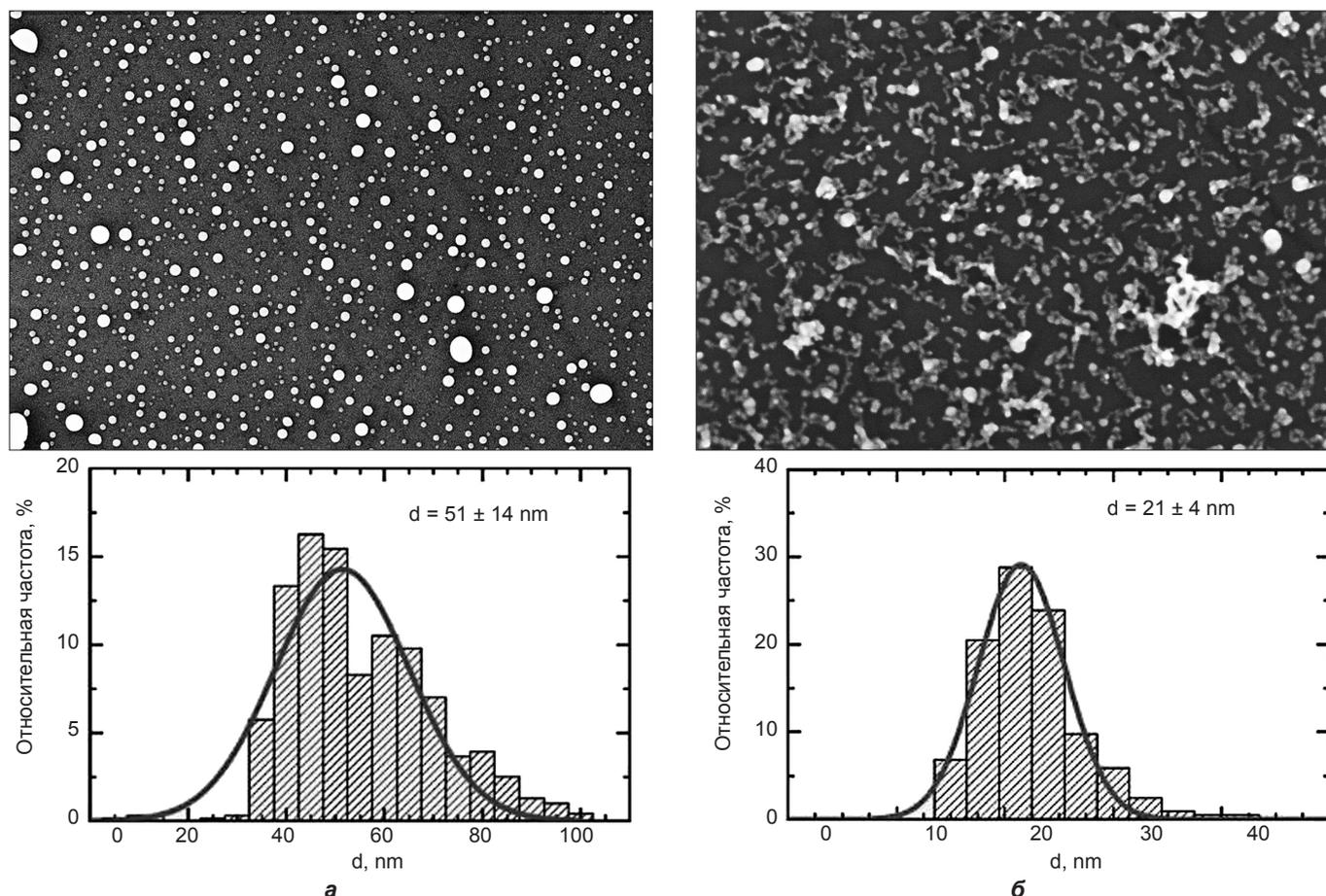


Рис. 1. СЭМ-фотографии (а) SeO-НЧ и (б) CuO-НЧ и соответствующие функции распределения по размерам.

Fig. 1. SEM visualization of (a) SeO-NPs and (б) CuO-NPs and respective size distribution functions.

тех случаях, когда зависимость отклика от дозы вещества монотонна. Проблема становилась еще более сложной, когда эта зависимость была немонотонной.

Доза – реакция была описана с использованием двух функций:

- функцией Хилла (1), пропорциональной кумулятивной функции лог-логистического распределения [10, 11].

$$y = b_0 + \frac{b_1}{1 + (b_2 x)^{b_3}}, \quad (1)$$

где b_0, \dots, b_3 – параметры, определяемые методом наименьших квадратов по экспериментальным данным;

- гиперболической функцией (2), связанной с уравнением Михаэлиса–Ментен, которое используется, например, для описания скорости ферментативных реакций [12],

$$y = \frac{b_0 + b_1 x}{b_2 + b_3 x} \quad (2)$$

Результаты

Экспериментальные данные о связи между снижением АТФ-зависимой люминесценции и дозой SeO-НЧ в культуре фибробластоподобных клеток имеют монотонный характер, хотя и с наличием заметного плато в середине диапазона.

Адекватной моделью в этом случае является линейная комбинация синусов. Для этой конечной точки модель предсказывает кинетику его уменьшения, как показано кривой на рис. 2.

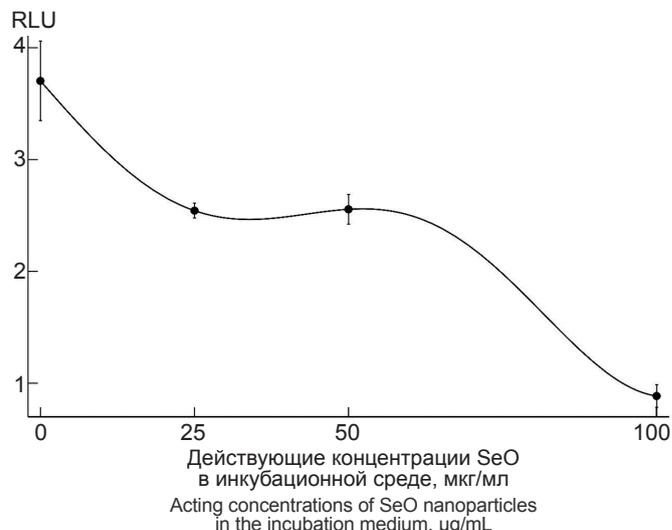


Рис. 2. Аппроксимация модели $y = 3.703 - 2.119\sin(0.025x) - 0.2\sin(0.035x) + 0.781\sin(0.055x) - 1.279\sin(0.065x)$ снижения АТФ-зависимой люминесценции в культуре клеток при воздействии различных доз SeO-НЧ. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего.

Fig. 2. Model approximation $y = 3.703 - 2.119\sin(0.025x) - 0.2\sin(0.035x) + 0.781\sin(0.055x) - 1.279\sin(0.065x)$ of the reduction in ATP-dependent luminescence in the cell culture under exposure to various doses of SeO-NP. The dots indicate the mean values with the standard error of the mean.

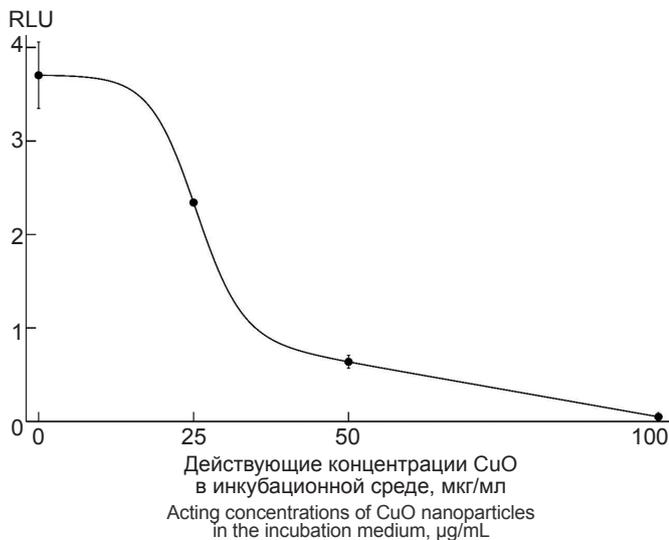


Рис. 3. Аппроксимация модели $y = 3.706 - \frac{0.012x + 2.488}{1 + e^{0.269(25.138-x)}}$ снижения АТФ-зависимой люминесценции в культуре клеток при воздействии различных доз SeO-НЧ. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего.

Fig. 3. Approximation by model $y = 3.706 - \frac{0.012x + 2.488}{1 + e^{0.269(25.138-x)}}$ of the reduction in ATP-dependent luminescence in the cell culture under exposure to various doses of CuO-NP. The dots indicate the mean values with the standard error of the mean.

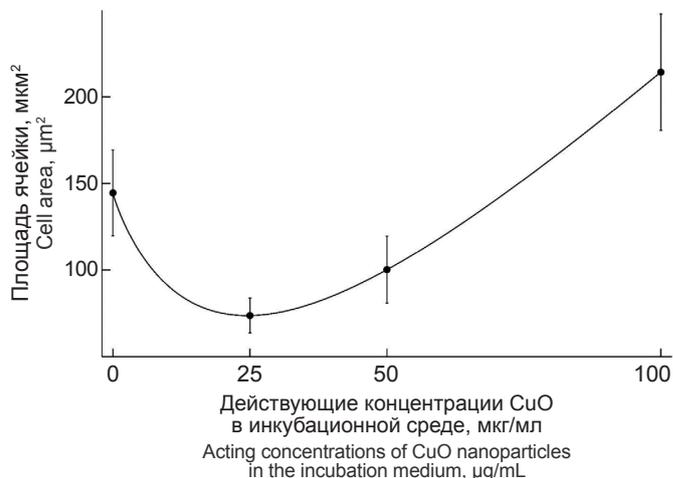


Рис. 5. Аппроксимация площади клеток моделью

$$y = 144.56 - 424.72 \left(\frac{x}{x + 38.61} \right)^{0.884} + 13391.7 \left(\frac{x}{x + 5400.08} \right)^{0.884}$$

в культуре клеток при воздействии различных доз CuO-НЧ. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего.

Fig. 5. Approximation of the cell area by the model

$$y = 144.56 - 424.72 \left(\frac{x}{x + 38.61} \right)^{0.884} + 13391.7 \left(\frac{x}{x + 5400.08} \right)^{0.884}$$

in the cell culture under exposure to various doses of CuO-NP. The dots indicate the mean values with the standard error of the mean.

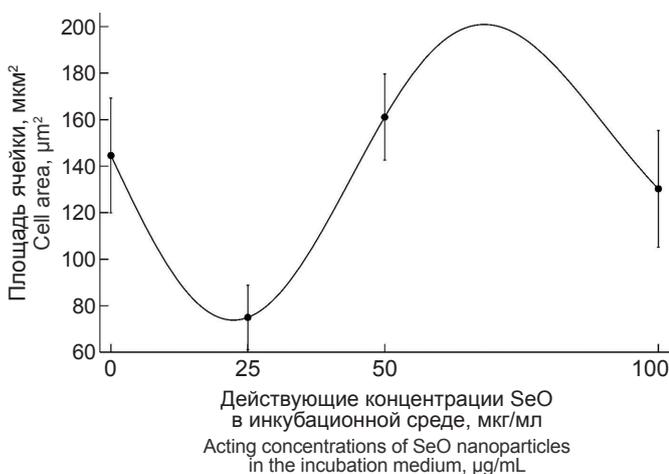


Рис. 4. Аппроксимация площади клеток моделью $y = 144.57 - 35.06\sin(0.06x) - 21.44\sin(0.07x) - 9.08\sin(0.08x) - 5.23\sin(0.09x) - 2.03\sin(0.1x)$ в культуре клеток при воздействии различных доз SeO-НЧ. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего.

Fig. 4. Approximation of the cell area by the model $y = 144.57 - 35.06\sin(0.06x) - 21.44\sin(0.07x) - 9.08\sin(0.08x) - 5.23\sin(0.09x) - 2.03\sin(0.1x)$ in the cell culture under exposure to various doses of SeO-NP. The dots indicate the mean values with the standard error of the mean.

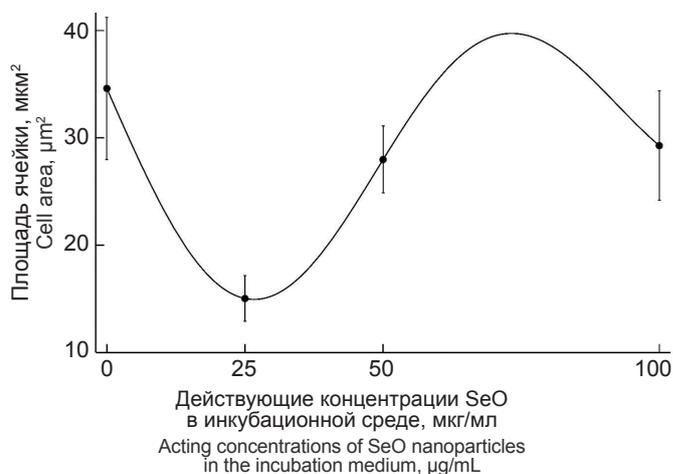


Рис. 6. Аппроксимация площади ядра клетки моделью $y = 34.60 - 8.08\sin(0.03x) - 1.76\sin(0.04x) + 0.65\sin(0.05x) - 4.13\sin(0.06x) - 9.21\sin(0.07x)$ в культуре клеток при воздействии различных доз SeO-НЧ. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего.

Fig. 6. Approximation of the area of the cell nucleus by the model $y = 34.60 - 8.08\sin(0.03x) - 1.76\sin(0.04x) + 0.65\sin(0.05x) - 4.13\sin(0.06x) - 9.21\sin(0.07x)$ in the cell culture under exposure to various doses of SeO-NP. The dots indicate the mean values with the standard error of the mean.

Подобная зависимость для CuO демонстрирует ещё более явный монотонный характер, хотя и здесь качество аппроксимации моделями (1) и (2) оказывается недостаточным. В то же время вполне удовлетворительную аппроксимацию этой зависимости обеспечивает модель, приведённая в подписи к рис. 3.

Отметим также, что в то время как при минимальных концентрациях НЧ интенсивность цитотоксического воздействия, производимого SeO-НЧ и

CuO-НЧ, практически одинакова, при концентрациях более 25 мкг/мл CuO-НЧ оказываются более цитотоксичными. Предполагается, что в этом диапазоне доз неблагоприятное воздействие SeO-НЧ на клетки частично компенсируется цитопротекторным эффектом селена как эссенциального микроэлемента, присутствующего в наночастицах [4]. Между тем в литературе мы не встречали упоминаний о подобном защитном действии наночастиц, содержащих медь.

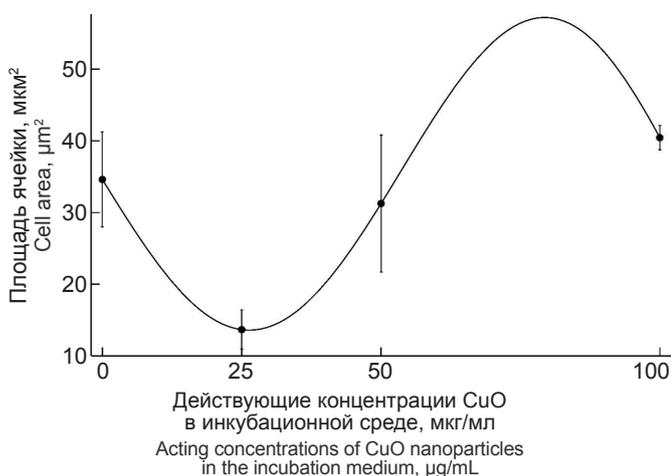


Рис. 7. Аппроксимация площади ядра клетки моделью $y = 34.60 - 18.98\sin(0.06x) - 4.78\sin(0.07x) + 1.90\sin(0.08x) - 2.39\sin(0.09x) - 1.49\sin(0.1x)$ в культуре клеток при воздействии различных доз CuO-НЧ. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего.

Fig. 7. Approximation of the area of the cell nucleus by the model $y = 34.60 - 18.98\sin(0.06x) - 4.78\sin(0.07x) + 1.90\sin(0.08x) - 2.39\sin(0.09x) - 1.49\sin(0.1x)$ in the cell culture under exposure to various doses of CuO-NP. The dots indicate the mean values with the standard error of the mean.

Зависимость доза-эффект для площади клеток под воздействием наночастиц обоих видов оказалась немонокотной и потребовала специальных моделей для их описания (рис. 4, 5).

В то же время воздействие наночастиц CuO выявило картину гормезиса, соответствующую его традиционному пониманию (см. рис. 5), которую можно описать известной зависимостью [5].

Ясно, что в случае SeO-НЧ мы имеем дело с гормезисом, хотя и рассматриваемым в более широком смысле, в то время как традиционные приближения двухфазного гормезиса [6] в этом случае недостаточны. Между тем приведённая в подписи к рисунку зависимость оказалась вполне удовлетворительной и в то же время не слишком сложной.

При аналогичной оценке зависимость площади клетка-ядро от дозы как для наночастиц SeO, так и для CuO оказалась однотипной, трёхфазной, что, вероятно, отражает несходство механизмов, ответственных за увеличение клетки и размера ядра (рис. 6, 7).

Обсуждение

Монокотный тип зависимости со снижением жизнеспособности в тесте МТТ был неоднократно продемонстрирован в экспериментах на разных типах клеточных линий (МСF-7, раковые клетки молочной железы и HT-1080, клетки фибросаркомы человека), но с использованием биологически синтезированных изолированным штаммом бактерий *Bacillus* spp. MSh-1 наночастиц Se. Подобный монокотный эффект, связанный с образованием активных форм кислорода, был получен на культуре клеток альвеолярного эпителия ТТ1 при воздействии наночастиц оксида меди. Прямая дозо-временная зависимость жизнеспособности клеточной линии рака лёгкого A549 при воздействии наночастиц селена, полученных из семян *Mucuna pruriens*, также была показана экспериментально [7–9].

Однако для определения типа зависимости доза-эффект экспериментальные данные для конкретного индекса ис-

хода должны быть аппроксимированы соответствующим функциональным выражением, а выбор аппроксимирующих функций не определяется однозначно даже там, где зависимость от дозы агента является монокотной. Проблема становится ещё более сложной, если зависимость немонотонна.

Ещё труднее найти подходящую математическую модель для немонотонной зависимости доза-эффект. Хотя существует множество функциональных выражений для описания отношений этого типа, ни одно из них не является универсальным, ограничиваясь лишь определённой областью исследования.

В то же время немонотонная взаимосвязь часто связана с проявлениями гормезиса в тех случаях, когда эффект направлен противоположно в двух соседних интервалах доз. Это делает теоретическое обобщение различных вариантов немонотонной зависимости доза-эффект намного более сложной проблемой, поскольку этот тип зависимости может включать более двух фаз такого типа [13, 14]. Задача аппроксимации таких многофазных отношений типа, связанного с гормезисом, становится сложной задачей, которая требует использования более сложных или специальных функций.

Следует отметить, что в исследовании воздействия наночастиц CdS и PbS дозозависимое изменение жизнеспособности клеток, измеренное с помощью АТФ-люминесценции, также было монокотным, в то время как зависимость морфометрических характеристик оказалась немонотонной по гормезис-ассоциированному типу, несмотря на то, что в двух наших исследованиях участвовали НЧ разного состава и клетки принципиально разного типа (кардиомиоциты и фибробласты). У нас пока нет достаточных экспериментальных данных, чтобы рассматривать это совпадение как закономерность и делать предположения относительно этих механизмов. Однако целесообразно зафиксировать отмеченную закономерность и вернуться к этому вопросу, когда появятся новые данные.

В то же время данные, которые мы получили к настоящему времени, позволяют нам предположить, что тип зависимости доза-эффект, будь то монокотный или немонотонный, не предопределён типом клетки или химической природой воздействующих наночастиц; скорее, это зависит от результата воздействия, оцениваемого как реакция.

Заключение

Наночастицы оксида селена и оксида меди при воздействии на фибробластоподобные клетки *in vitro* оказывают цитотоксический эффект, проявляющийся в уменьшении АТФ-зависимой люминесценции, причём CuO-НЧ оказывает несколько более сильный эффект, чем SeO-НЧ. Наряду с гипертрофией клеток под действием определённых доз SeO-НЧ и CuO-НЧ наш эксперимент также выявил дозы, вызывающие уменьшение размера клетки и ядра.

Мы получили как монокотные, так и различные варианты немонотонных зависимостей доза-эффект, и для последних были смоделированы адекватные математические выражения, основанные на обобщённой парадигме гормезиса, рассмотренной нами ранее в отношении цитотоксичности CdS-НЧ и PbS-НЧ для кардиомиоцитов.

В целом анализ данных, полученных в вышеупомянутых исследованиях, позволяет нам предположить, что вариативность типов зависимости доза-эффект, проявляемая различными эффектами цитотоксичности наночастиц, является общим правилом, что делает его интересным для сбора дополнительных экспериментальных данных.

Литература / References

1. Panov V.G., Minigalieva I.A., Bushueva T.V., Fröhlich E., Meindl C., Absenger-Novak M., et al. Some peculiarities in the dose dependence of separate and combined *in vitro* cardiotoxicity effects induced by CdS and PbS nanoparticles with special attention to hormesis manifestations. *Dose Response*. 2020; 18(1): 1559325820914180. <https://doi.org/10.1177/1559325820914180>
2. Katsnelson B.A., Panov V.G., Minigalieva I.A., Bushueva T.V., Gurvich V.B., Privalova L.I., et al. On an extended understanding of the term "hormesis" for denoting alternating directions of the organism's response to increasing adverse exposures. *Toxicology*. 2021; 447: 152629. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152629>
3. Bushueva T.V., Minigalieva I.A., Panov V.G., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Shur V.Y., et al. Comparative and combined *in vitro* vasotoxicity of nanoparticles containing lead and cadmium. *Dose Response*. 2021; 19(1): 1559325820982163. <https://doi.org/10.1177/1559325820982163>
4. Yuan B., Webster T.J., Roy A.K. Cytoprotective effects of cerium and selenium nanoparticles on heat-shocked human dermal fibroblasts: An *in vitro* evaluation. *Int. J. Nanomedicine*. 2016; 11: 1427–33. <https://doi.org/10.2147/ijn.s104082>
5. Kleiber C., Kotz S. *Statistical Size Distributions in Economics and Actuarial Sciences. Wiley Series in Probability and Statistics*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2003.
6. Nweke C.O., Ogbonna C.J. Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 2017; 12(1): 39–55. <https://doi.org/10.5132/eec.2017.01.06>
7. Shakibaie M., Khorramizadeh M.R., Faramarzi M.A., Sabzevari O., Shahverdi A.R. Biosynthesis and recovery of selenium nanoparticles and the effects on matrix metalloproteinase-2 expression. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010; 56(1): 7–15. <https://doi.org/10.1042/ba20100042>
8. Katsumiti A., Thorley A.J., Arostegui I., Reip P., Valsami-Jones E., Tetley T.D., et al. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells *in vitro* and comparative sensitivity with human cells. *Toxicol. In Vitro*. 2018; 48: 146–58. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.013>
9. Misra S.K., Nuseibeh S., Dybowska A., Berhanu D., Tetley T.D., Valsami-Jones E. Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2014; 8(4): 422–32. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.796017>
10. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York, NY: Wh. Freeman; 2013: 158–62.
11. Johnson K.A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Lett.* 2013; 587(17): 2753–2766. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.012>
12. Kong E.Y., Cheng S.H., Yu K.N. Biphasic and triphasic dose responses in zebrafish embryos to low-dose 150 kV X-rays with different levels of hardness. *J. Radiat. Res.* 2016; 57(4): 363–9. <https://doi.org/10.1093/jrr/trw026>
13. Lopez S., France J., Gerrits W.J., Dhanoa M.S., Humphries D.J., Dijkstra J. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *J. Anim. Sci.* 2000; 78(3): 1816–28. <https://doi.org/10.2527/2000.7871816x>
14. Choi V.W., Yum E.H., Konishi T., Oikawa M., Cheng S.H., Yu K.N. Triphasic low-dose response in zebrafish embryos irradiated by microbeam protons. *J. Radiat. Res.* 2012; 53(3): 475–81.