



Сутункова М.П.<sup>1</sup>, Минигалиева И.А.<sup>1</sup>, Привалова Л.И.<sup>1</sup>, Рябова Ю.В.<sup>1</sup>,  
Макеев О.Г.<sup>2</sup>, Зубарев И.В.<sup>3,4</sup>, Шишкина Е.В.<sup>4</sup>, Бушуева Т.В.<sup>1</sup>, Кацнельсон Б.А.<sup>1</sup>

## Влияние наночастиц оксида цинка на организм крыс в остром и подостром экспериментах

<sup>1</sup>ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», 620028, Екатеринбург, Россия;

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, 141701, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФБУН «Институт естественных наук и математики» УрФУ, 620026, Екатеринбург, Россия

**Введение.** В медеплавильном производстве, особенно при выплавке латуни и меди, воздух рабочих помещений загрязнен наночастицами оксида цинка. Цинк и его соединения обладают широким спектром токсического действия с многообразной клинической симптоматикой. В основе многих проявлений цинковой интоксикации лежат конкурентные отношения с рядом других металлов — в том числе кальцием, медью, железом. При длительном введении лабораторным грызунам цинка или его соединений проявляется влияние на активность ферментов, углеводный и минеральный обмен.

**Материалы и методы.** Субхроническая интоксикация при повторных внутрибрюшинных введениях и острая реакция глубоких дыхательных путей на однократное интратрахеальное введение наночастиц цинка моделировалась на аутобредных белых крысах-самцах. В обоих экспериментальных моделях использовались водные суспензии наночастиц оксидов цинка диаметром 30–80 нм. По завершении экспозиции состояние организма крыс во всех группах оценивалось по ряду общепризнанных критериев токсического действия. Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты.** Показано развитие умеренной интоксикации в субхроническом эксперименте. Выявлены однородные ультраструктурные изменения ткани селезенки, наиболее частыми из которых являются повреждение митохондрий с частичной или полной потерей крист. Статистически значимо увеличен коэффициент фрагментации ДНК. При однократном интратрахеальном введении наночастиц оксида цинка показано усиление аттракции способных к их фагоцитозу клеток (особенно нейтрофильных лейкоцитов) в глубокие дыхательные пути, что свидетельствует об их цитотоксическом действии.

**Заключение.** Выявлено общетоксическое и цитотоксическое действие наночастиц оксида цинка на организм крыс.

**Ключевые слова:** цинк; наночастицы; токсичность; цитотоксичность

**Для цитирования:** Сутункова М.П., Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Рябова Ю.В., Макеев О.Г., Зубарев И.В., Шишкина Е.В., Бушуева Т.В., Кацнельсон Б.А. Влияние наночастиц оксида цинка на организм крыс в остром и подостром экспериментах. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (7): 704–710. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-704-710>

**Для корреспонденции:** Минигалиева Ильзира Амировна, доктор биол. наук, зав. отд. токсикологии и биопрофилактики ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: [ilzira-minigalieva@yandex.ru](mailto:ilzira-minigalieva@yandex.ru)

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов:** Сутункова М.П. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Минигалиева И.А. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Привалова Л.И. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Рябова Ю.В. — концепция и дизайн исследования, статистическая обработка, подготовка рисунков; Макеев О.Г. — сбор и обработка материала; Зубарев И.В. — сбор и обработка материала, подготовка рисунков; Шишкина Е.В. — сбор и обработка материала; Бушуева Т.В. — сбор и обработка материала; Кацнельсон Б.А. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование.

Поступила 02.04.2021 / Принята к печати 18.05.2021 / Опубликована 31.07.2021

Marina P. Sutunkova<sup>1</sup>, Ilzira A. Minigalieva<sup>1</sup>, Iuliia V. Privalova<sup>1</sup>, Iuliia V. Ryabova<sup>1</sup>,  
Oleg G. Makeev<sup>2</sup>, Iliia V. Zubarev<sup>3,4</sup>, Ekaterina V. Shishkina<sup>4</sup>, Tatiana N. Bushueva<sup>1</sup>,  
Boris A. Katsnelson<sup>1</sup>

## Impact of toxicity effects of zinc oxide nanoparticles in rats within acute and subacute experiments

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

<sup>2</sup>Ural State Medical University, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation;

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, 141701, Russian Federation;

<sup>4</sup>Institute of Natural Sciences and Mathematics, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation

**Introduction.** Occupational air is contaminated with zinc oxide nanoparticles in the copper smelting industry, especially in the smelting of brass and copper. A wide range of toxic effects with varied clinical symptomatology is observed in zinc and its compounds. Competitive relations with many other metals, including calcium, copper, and iron, are the foundation of most cases of zinc intoxication. Long-term administration of zinc or its compounds to laboratory rodents affects enzymes, carbohydrates and mineral metabolism.

**Materials and methods.** Subchronic intoxication with repeated intraperitoneal injections and acute low respiratory tract reaction to a single intratracheal injection of zinc nanoparticles were simulated in outbred white rats. Water suspensions of zinc oxide nanoparticles with a 30–80 nm diameter were applied in both

experimental models. Upon completion of the exposure, the condition of the rats in all groups was evaluated in many generally accepted criteria for toxicity. The student's *t*-test was applied for statistical analysis of the obtained data.

**Results.** Moderate intoxication development in a subchronic experiment is demonstrated. Homogeneous ultrastructural changes in the spleen tissue were revealed. Mitochondrial damage with partial or complete loss of cristae is the most common. The fragmentation ratio of DNA was found by a statistically significant increase. A single intratracheal injection of zinc oxide nanoparticles revealed the increase in the attraction of cells capable of their phagocytosis (mainly neutrophils) into the low respiratory tract. This shows their cytotoxicity.

**Conclusion.** Moderate general toxic and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on the rat body were identified.

**Keywords:** zinc; nanoparticles; toxicity; genotoxicity

**For citation:** Sutunkova M.P., Minigaliev I.A., Privalova L.I., Ryabova Iu.V., Makeyev O.G., Zubarev I.V., Shishkina E.V., Bushueva T.V., Katsnelson B.A. Impact of toxicity effects of zinc oxide nanoparticles in rats within acute and subacute experiments. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100 (7): 704-710. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-7-704-710> (In Russ.)

**For correspondence:** Ilzira A. Minigaliev, MD, PhD, Head of the Department of Toxicology and Bioprophylaxis, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 620014, Yekaterinburg, Russia. E-mail: [ilzira-minigaliev@yandex.ru](mailto:ilzira-minigaliev@yandex.ru)

#### Information about authors:

Sutunkova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>; Minigaliev I.A., <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>; Privalova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>; Ryabova Iu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>; Makeyev O.G., <https://orcid.org/0000-0001-6819-3185>; Zubarev I.V., <https://orcid.org/0000-0002-7827-498X>; Shishkina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2574-7472>; Bushueva T.V., <https://orcid.org/0000-0002-5872-2001>; Katsnelson B.A., <https://orcid.org/0000-0001-8750-9624>

**Contribution:** *Sutunkova M.P.* – concept and design of the study, writing the text, editing; *Minigaliev I.A.* – concept and design of the study, writing the text, editing; *Privalova L.I.* – concept and design of the study, writing the text, editing; *Ryabova Iu.V.* – concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, preparation of drawings; *Makeyev O.G.* – collection and processing of material; *Zubarev I.V.* – concept and design of the study, preparation of drawings; *Shishkina E.V.* – collection and processing of material; *Bushueva T.V.* – collection and processing of material; *Katsnelson B.A.* – concept and design of the study, writing the text, editing. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: April 02, 2021 / Accepted: May 18, 2021 / Published: July 31, 2021

## Введение

Среди металлосодержащих наночастиц цинковые являются третьими в мировом объёме производства после SiO<sub>2</sub> и TiO<sub>2</sub> (5500 и 3000 тонн соответственно) [1]. Вместе с тем многие металлические и металло-оксидные аэрозоли конденсации с частицами субмикронного и наноразмерного диапазона образуются как побочный продукт пирометаллургических технологий. В частности, в медеплавильном производстве и особенно при выплавке латуни и меди имеет место загрязнение воздуха рабочих помещений наночастицами оксида цинка (ZnO-НЧ).

Соединения цинка обладают широким спектром токсического действия с различными клиническими проявлениями [2–5]. Поступление в организм цинка в дозах выше 2,24 мг элементарного цинка в сутки приводило к отравлению с рядом симптомов со стороны ЖКТ, проявлению патологии почек и развитию желтухи. Цинк обладает кумулятивным эффектом. Конкурентные взаимодействия с другими металлами лежат в основе многих проявлений цинковой интоксикации. Предполагается, что антагонизм между цинком и кальцием осуществляется на уровне клеточных мембран. Избыточное поступление цинка в организм может привести к развитию остеопороза из-за снижения уровня кальция не только в крови, но и в костях, а также одновременного нарушения усвоения фосфора [6]. Вредное действие цинка на морфологический состав крови связывают с нарушением всасывания и удержания клетками меди. Антагонизм с железом, кадмием и свинцом изучен в меньшей степени, хотя известно, что при интоксикации свинцом резко увеличивается экскреция цинка с мочой [7].

При хроническом воздействии цинковой пыли на человека появляются жалобы на работу желудочно-кишечного тракта, нарушение сна, ухудшение слуха. Объективно обнаруживаются гипохромная анемия, гипогликемия, гипохолестеринемия, повышение содержания уробилина и порфиринов в моче, изменения в работе поджелудочной железы и печени. Со стороны дыхательной системы – субатрофические катары верхних дыхательных путей, фиброз лёгких, усиление лёгочного рисунка при рентгенографии, начальные признаки пневмоклероза. При длительном введении мышам, крысам и кроликам цинка или его соединений проявляется влияние на активность многих ферментов – цитохромоксидазы, щелочной фосфатазы (ЩФ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ),

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фосфатазы и энтерокиназы двенадцатиперстной кишки, а также влияние на углеводный и минеральный обмен [6].

Мутагенное действие цинка может быть связано с тем, что ионы этого металла включаются в активные центры ДНК- и РНК-полимераз, которые контролируют нормальный процесс репликации и транскрипции ДНК. Цинк внесён в Российский официальный перечень канцерогенных факторов [8], а большинство международных агентств признаёт не только человеческие, но и экспериментальные данные о канцерогенности цинка неадекватными.

Экспериментальные исследования, проводившиеся с ZnO-НЧ на клеточных культурах и лабораторных животных, также указывают на высокую токсичность этих наночастиц [9–13], однако число таких работ и оценённых ими эффектов ограничено. Поэтому целью нашей работы было оценить резорбтивную токсичность наночастиц цинка при внутрибрюшинном введении и их цитотоксичность при интратрахеальном введении.

## Материалы и методы

В эксперименте мы использовали водные суспензии наночастиц оксидов цинка диаметром 30–80 нм и концентрацией 0,5 мг/мл, полученные в Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» Уральского федерального университета с помощью лазерной абляции в стерильной деионизированной воде. Стабильные суспензии Me-НЧ были получены из тонких листов мишени цинка 99,99% чистоты под слоем стерильной деионизированной воды (рис. 1). Наночастицы ZnO были палочковидными (приблизительно – цилиндрическими) с размерами 30 ± 11 × 83 ± 20 нм. Расчётная средняя величина поверхности частицы равняется 9236 нм<sup>2</sup> (рис. 2). Стабильность суспензий характеризовалась величиной дзета-потенциала, измеренного с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), и была высокой (дзета-потенциал вплоть до 42 мВ).

Для создания экспериментальных моделей субхронической интоксикации при повторных внутрибрюшинных введениях и острой реакции глубоких дыхательных путей на однократное интратрахеальное введение наночастиц цинка были использованы аутбредные белые крысы-самцы с исходной массой тела 200–220 г, по 12 животных в каждой группе. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с

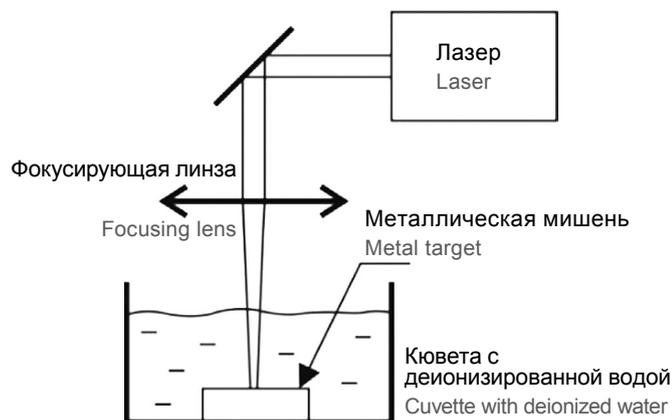


Рис. 1. Схема метода получения водной суспензии Me-НЧ.

Fig. 1. Schematic of the method for obtaining an aqueous suspension of Me-NPs.

принципами [14] и с одобрения локальной комиссии по биоэтике ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Проведены два независимых эксперимента. В одном из них модель субхронической интоксикации была получена путём повторных внутрибрюшинных инъекций изучаемой наносуспензии по 3 инъекции еженедельно на протяжении 6 нед. Крысы двух групп, наблюдавшихся параллельно, получали: ZnO-НЧ по 0,5 мг в 1 мл суспензии на стерильной деионизированной воде; контроль интактный – деионизированную воду в том же объёме.

В субхроническом эксперименте исследовано большое число физиологических, цитологических и биохимических показателей состояния организма контрольных и подопытных животных в конце экспозиционного периода, на протяжении которого велось наблюдение за общим состоянием крыс, проводился контроль массы тела животных (всего 7 взвешиваний, последнее непосредственно перед умерщвлением). Для изучения функционального состояния центральной нервной системы использовали наиболее часто применяемый в экспериментальной токсикологии суммационно-пороговый показатель [15]. Высшая нервная деятельность животных характеризовалась показателем исследовательского поведения через сутки восстановительного периода от последнего введения – «норковый рефлекс», который оценивался числом заглядываний в отверстие («норки») за 3 мин. При умерщвлении крыс взяты пробы крови для определения содержания гемоглобина, числа эритроцитов, доли ретикулоцитов в них, лейкоцитарной формулы крови, а также активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови. Уровень гемоглобина и эритроцитов определяли с помощью гематологического анализатора «Methic 18» с использованием соответствующих диагностических наборов. Лейкоцитарную формулу подсчитывали в окрашенных мазках крови. Активность СДГ оценивали цитохимически с использованием пара-нитрофиолетового тетразолия и выражали количеством гранул формазана в 50 клетках [16]. Содержание общего белка и соотношение белковых фракций (альбуминов и глобулинов) – альбумин-глобулиновый индекс, активность аминотрансфераз – аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы [17] определяли с целью оценки функционального состояния печени. Проводили также определение содержания копропорфирина и дельта-аминолевулиновой кислоты в моче, свидетельствующие о состоянии порфиринового обмена [17]. Для оценки состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы организма исследовали содержание в крови малонового диальдегида и активность каталазы [17]. Методом атомно-эмиссионной спектроскопии определялось содержание цинка в моче, крови и кале.

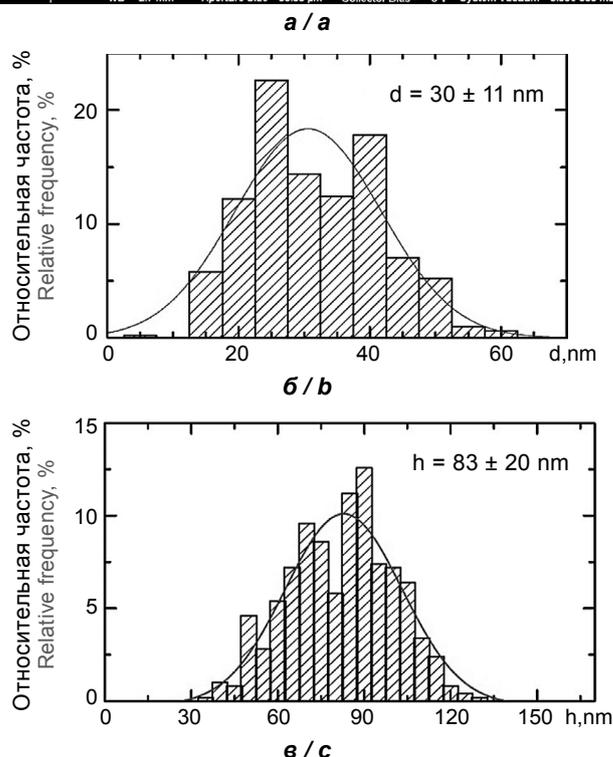


Рис. 2. Наночастицы ZnO в суспензии, приготовленной для экспериментов: а – сканирующая электронная микроскопия с увеличением  $\times 52\,580$ ; б – функция распределения частиц по диаметру (d) основания; в – функция распределения частиц по высоте (h) цилиндра.

Fig. 2. ZnO nanoparticles in a suspension prepared for experiments: a – scanning electron microscopy with magnification  $\times 52\,580$ ; b – the distribution function of particles by the base diameter (d) of the base; c – the distribution function of particles by the base diameter height (h) of the cylinder.

Оценка коэффициента фрагментации ДНК проводилась методом анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК на ядерных клетках циркулирующей крови. Рандомизированные олигонуклеотидные и NotI-STS праймеры были сконструированы online с помощью сервиса Oligo version 3.0 (www.oligo.net) и синтезированы на автоматическом синтезаторе ASM 800 (фирма «Биоссет»).

Оптимальный режим амплификации выбрали, исходя из длины амплифицируемого фрагмента после пробного цикла моделирования температурного градиента. Стадии начальной денатурации (2 мин при  $94^\circ\text{C}$ ) и конечной полимеризации (3 мин при  $72^\circ\text{C}$ ) были обязательными в

каждом пробном цикле амплификации. Количество циклов подбирали эмпирически для наибольшего выхода специфичного ампликона при минимальном содержании неспецифических фрагментов. Смесь в количестве 25 мкл помещали в амплификатор с заданной программой температурно-временных циклов:  $T_{\text{ден}} 94^{\circ}\text{C} - 2$  мин; ( $T_{\text{ден}} 95^{\circ}\text{C} - 0,2$  мин;  $T_{\text{отж}} 64^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{элон}} 72^{\circ}\text{C} - 0,5$  мин) – 29 циклов;  $T_{\text{элон}} 72^{\circ}\text{C} - 3$  мин.

Для повышения чувствительности при постановке реакции использовали специфические праймеры и нуклеотиды (dCTP, dATP, метил-dTTP, Amersham), меченные тритием. Полученный амплификат разделяли в процессе горизонтального агарозного гель-электрофореза в TAE-буфере при 100 В в течение 15 мин. По окончании электрофореза гелевые пластины были разделены на дорожки, в свою очередь разделённые на участки длиной 5 мм. Фрагменты геля помещали во флаконы, содержащие 3 мл абсолютного изопропанола, и нагревали до  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч. После экстракции из геля амплифицированных фрагментов, содержащих изотопную метку, во флаконы добавляли простой толуоловый сцинтиллятор (6 мл). Регистрацию результатов производили на автоматическом жидкостном сцинтилляционном счётчике «Бета-2».

Основой технологии идентификации степени повреждения ДНК является то, что в отличие от фрагментированной («хвостовой») ДНК нефрагментированная ядерная ДНК имеет крайне низкую степень миграции в агарозном геле, причём степень миграции прямо пропорциональна степени её повреждения.

Прямое сравнение между группами по критерию активности включенной метки в ядерные и хвостовые части исследуемых образцов не всегда информативно. Поэтому чаще нами используется значение соотношения ядерной и хвостовой частей в рамках одной группы – коэффициент фрагментации ДНК ( $K_{\text{фр}}$ ), рассчитываемый по формуле:

$$K_{\text{фр}} = \text{Сумм}_{\text{Ахф}} / A_{\text{ядр}}$$

где  $K_{\text{фр}}$  – коэффициент фрагментации;  $\text{Сумм}_{\text{Ахф}}$  – суммарная радиоактивность «хвостовых» фракций;  $A_{\text{ядр}}$  – радиоактивность «ядра».

Проведено также электронно-микроскопическое изучение содержания НЧ в селезёнке и ультраструктурных патологических изменений в них при действии ZnO-НЧ – с полуколичественной (балльной) оценкой последних. Для полуколичественной оценки повреждения митохондрий мы отметили каждый исследованный образец следующим образом: 0 баллов – митохондрии с видимым повреждением не обнаружены; 1 балл – ниже 50%; 2 балла – свыше 50% исследованных митохондрий имеют явное повреждение вплоть до полной потери крист. На основании этих баллов мы использовали 2 интегрированные оценки состояния митохондрий в органе, а именно: а) средневзвешенный арифметический показатель в баллах и б) доля митохондрий с любой потерей крист (то есть с баллом 1 или 2).

Во втором эксперименте крысам однократно вводили суспензию в лёгкие через трахею: ZnO-НЧ 0,2 мг в 1,2 мл стерильной деионизированной воды; контроль интактный – деионизированную воду в том же объёме. Через 24 ч у всех крыс исследовали клеточный состав и некоторые внеклеточные биохимические характеристики бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ).

При оценке острого действия ZnO-НЧ на глубокие дыхательные пути использовали подсчёт клеток в аликвотной пробе БАЛЖ, полученной через 24 ч после однократного интратрахеального введения НЧ, который осуществлялся меланжерным способом с пересчётом на весь объём БАЛЖ. Отцентрифугированный клеточный осадок использовали для приготовления мазков, окрашиваемых по Гимза–Романовскому, в которых проводили подсчёт клеток при оптической микроскопии с иммерсией. В на-

досадочной жидкости определяли содержание альбумина и активность ряда ферментов: аланин- и аспаратамино-трансфераз, амилазы, гамма-глутамилтранспептидазы и лактатдегидрогеназы.

Различия между среднегрупповыми количественными результатами обрабатывали с помощью критерия Стьюдента с использованием компьютерной программы Excel. Различия между средними величинами считали статистически значимым, если вероятность возникновения случайного различия не превышала 5% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

Содержание цинка в биосредах у экспериментальных групп животных, которые подвергались повторным внутривенным инъекциям суспензии ZnO-НЧ, оказалось следующим: в крови –  $2,640 \pm 0,121$  мкг/мл, в моче –  $0,057 \pm 0,003$  мкг/мл, в кале –  $65,020 \pm 3,436$  мкг/г. Каждая из приведённых выше величин статистически значимо (при  $p < 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента) отличалась от контрольной группы, цифры которых оказались ниже пределов определения (0,01 мкг/мл для мочи и 1 мкг/мл для крови и кала).

По данным сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии тканей селезёнки были определены средневзвешенный балл и доля повреждения митохондрий в селезёнке по исследованным группам крыс. Для контрольной группы средневзвешенный балл составил 0,049, доля повреждения митохондрий – 0,049; для опытной группы – 0,663 и 0,348 соответственно. Статистически значимо различаются степень повреждения митохондрий у контрольных и у экспонированных к ZnO-НЧ крыс.

У экспонированных крыс к ZnO-НЧ крыс отмечается статистически значимое снижение двигательной активности (по показателю – количество пересечённых квадратов). По гематологическим и биохимическим показателям было обнаружено статистически значимое изменение доли ретикулоцитов периферической крови, % тромбоцитов, % лимфоцитов, активности щелочной фосфатазы, альбуминов в сыворотке крови и креатинина в моче. Отмечено увеличение коэффициента фрагментации ДНК (см. таблицу).

После однократного интратрахеального введения водной суспензии ZnO-НЧ или стерильной деионизированной воды через 24 ч наблюдалось усиление аттракции способных к фагоцитозу клеток в глубокие дыхательные пути. Общая клеточность,  $\times 10^6$  в контрольной группе составила  $1,4 \pm 0,07$ , в опытной –  $4,57 \pm 0,72$ . Число альвеолярных макрофагов (АМ)  $\times 10^6$  в контрольной группе составило  $1,30 \pm 0,07$ , в опытной –  $2,21 \pm 0,36$ . Число нейтрофильных лейкоцитов (НЛ)  $\times 10^6$  в контрольной группе составило  $0,094 \pm 0,029$ , в опытной –  $2,36 \pm 0,60$ . Отношение НЛ/АМ представлено на рис. 3. При этом общая клеточность, число АМ и отношение НЛ/АМ статистически значимо отличались в опытной группе от соответствующих контрольных величин при  $p < 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента.

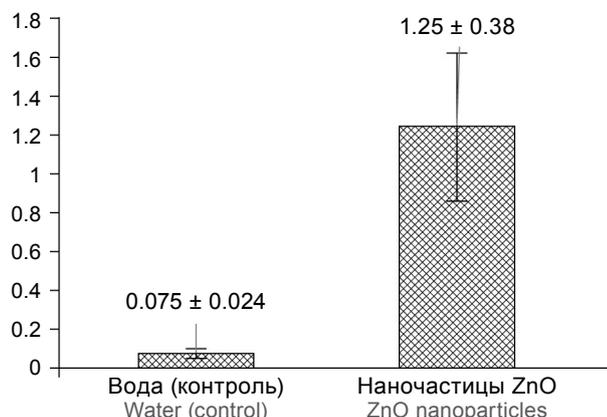
Изменены характеристики внеклеточной фракции бронхоальвеолярного лаважа. После однократного интратрахеального введения водной суспензии ZnO-НЧ или стерильной деионизированной воды через 24 ч наблюдалось статистически значимое увеличение активности аспарат-трансаминазы (контрольная группа –  $10,78 \pm 1,39$  Е/л; опытная группа –  $15,8 \pm 1,4$  Е/л) и амилазы (контрольная группа –  $6,56 \pm 1,20$  Е/л, опытная –  $20,3 \pm 3,1$  Е/л. Количество альбуминов (контрольная группа –  $1,90 \pm 0,08$  г/л, опытная –  $2,03 \pm 0,06$  г/л) и активность аланин-трансферазы (контрольная группа –  $1,87 \pm 0,29$  Е/л, опытная –  $2,47 \pm 0,32$  Е/л), лактатдегидрогеназы (контрольная группа –  $54,60 \pm 10,74$  Е/л, опытная –  $69,7 \pm 8,7$  Е/л), гамма-глутамилтранспептидазы (контрольная группа –  $1,01 \pm 0,52$  Е/л, опытная –  $2,80 \pm 0,83$  Е/л) не отличались статистически значимо от контрольных величин.

**Некоторые показатели состояния организма крыс, подвергшихся субхроническому воздействию наночастиц оксида цинка ( $x \pm Sx$ )**  
**Some indicators of the rats' condition after subchronic exposure to zinc oxide nanoparticles ( $x \pm Sx$ )**

Показатель / Indicator		Группы крыс / Groups of rats	
		Контроль / Control	ZnO-НЧ / NP
Прирост массы тела, %	Body weight gain, %	34.10 ± 2.54	27.34 ± 2.34
Число заглядываний в «норки» в течение 3 мин	Number of head-dips into holes during 3 min	7.17 ± 1.33	4.42 ± 0.99
Количество пересечённых квадратов в течение 3 мин	Number of crossed squares within 3 min	15.75 ± 2.18	<b>8.58 ± 1.18*</b>
Сумационно-пороговый показатель, с	Temporal summation of sub-threshold impulses, sec	14.02 ± 1.28	17.33 ± 1.00
Гемоглобин, г/л	Hemoglobin, g/l	157.75 ± 5.62	163.50 ± 4.40
Гематокрит, %	Hematocrit, %	21.63 ± 0.89	22.94 ± 0.76
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> клеток/л	Red blood cells, 10 <sup>12</sup> cells/L	7.29 ± 0.19	7.59 ± 0.20
Средний объём эритроцита, мкм <sup>3</sup>	Average red blood cell volume, μm <sup>3</sup>	116.70 ± 1.13	119.18 ± 1.82
Ретикулоциты, %	Reticulocytes, %	11.50 ± 1.33	<b>20.92 ± 1.86*</b>
Тромбоциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	Platelets, 10 <sup>3</sup> / μl	790.50 ± 53.19	909.00 ± 50.00
Тромбокрит, %	Thrombocrit, %	0.49 ± 0.03	<b>0.59 ± 0.03*</b>
Лейкоциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	White blood cells, 10 <sup>3</sup> / μl	10.83 ± 1.45	11.05 ± 0.72
Лимфоциты, %	Lymphocytes, %	75.13 ± 0.64	<b>72.00 ± 0.33*</b>
Моноциты, %	Monocytes, %	6.50 ± 0.46	6.38 ± 0.32
Эозинофилы, %	Eosinophils, %	2.38 ± 0.26	3.25 ± 0.41
Сегментоядерные нейтрофилы, %	Segmented neutrophils, %	14.63 ± 0.96	17.00 ± 0.63
Палочкоядерные нейтрофилы, %	Rod-shaped neutrophils, %	1.38 ± 0.18	1.88 ± 0.44
Базофилы, %	Basophils, %	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
Активность СДГ, количество гранул формазана в 50 лимфоцитах	Succinate dehydrogenase activity, the number of formazan granules in 50 lymphocytes	703.67 ± 35.46	634.22 ± 29.06
Церулоплазмин в сыворотке крови, мг/%	Serum ceruloplasmin, mg/%	96.37 ± 5.94	112.67 ± 6.20
МДА в сыворотке крови, мкмоль/л	MDA in blood serum, mmol/l	2.74 ± 0.37	3.08 ± 0.54
Каталаза в сыворотке крови, мкмоль/л	Serum catalase, mmol/L	0.92 ± 0.08	0.91 ± 0.10
Восстановленный глутатион в цельной крови, мкмоль/л	Reduced glutathione in whole blood, mmol/L	16.18 ± 1.85	15.51 ± 2.72
SH-группы в плазме крови, ммоль/л	SH-groups in blood plasma, mmol/L	19.81 ± 0.73	20.36 ± 0.58
Общий белок в сыворотке крови, г/л	Total serum protein, g/L	72.94 ± 1.67	72.93 ± 1.50
Альбумины в сыворотке крови, г/л	Serum albumins, g/L	43.18 ± 0.62	<b>40.88 ± 1.10*</b>
Глобулины в сыворотке крови, г/л	Serum globulins, g/L	29.14 ± 1.03	32.05 ± 1.52
A/G индекс	A/G index	1.47 ± 0.07	<b>1.30 ± 0.08*</b>
Активность АсАТ в сыворотке крови, Е/л	AST activity in blood serum, u/L	264.41 ± 22.96	285.45 ± 25.06
Активность АлАТ в сыворотке крови, Е/л	ALT activity in blood serum, u/L	70.34 ± 5.79	60.61 ± 4.92
Коэффициент де Ритиса	De Ritis ratio	3.82 ± 0.28	4.42 ± 0.30
Щелочная фосфатаза, Е/л	Alkaline phosphatase, u/L	236.81 ± 25.22	<b>158.35 ± 10.53*</b>
Креатинин в сыворотке крови, мкмоль/л	Serum creatinine, mmol/L	31.93 ± 1.33	32.68 ± 0.98
Билирубин в сыворотке крови, мкмоль/л	Serum bilirubin, mmol/L	1.08 ± 0.13	1.34 ± 0.17
Концентрация Ca <sup>2+</sup> в сыворотке крови, моль/л	Blood serum Ca <sup>2+</sup> concentration, mol/L	2.65 ± 0.03	2.66 ± 0.03
ЛДГ, Е/л	LDH, u/L	2634.38 ± 248.03	2748.00 ± 182.43
Мочевая кислота в сыворотке, мкмоль/л	Serum uric acid, mmol/L	135.25 ± 12.92	137.25 ± 9.75
Мочевина в сыворотке, ммоль/л	Serum urea, mmol/L	3.35 ± 0.23	3.75 ± 0.38
Объём мочи, мл	Urine volume, ml	25.00 ± 4.10	<b>44.86 ± 2.46*</b>
pH мочи	Urine pH	8.10 ± 0.46	<b>8.60 ± 0.10*</b>
Копропорфирин в моче, нмоль/л	Coproporphyrin in urine, nmol/L	63.46 ± 11.27	106.55 ± 29.16
Дельта-АЛК в моче, мкг/мл	Delta-ALA in urine, mcg/ml	8.11 ± 2.71	6.55 ± 1.79
Креатинин в моче, ммоль/л	Creatinine in urine, mmol/L	1.30 ± 0.26	<b>0.75 ± 0.04*</b>
Клиренс эндогенного креатинина	Endogenous creatinine clearance	1.03 ± 0.09	1.14 ± 0.04
Общий белок в моче, г/л	Total protein in the urine, g/L	162.68 ± 36.46	142.51 ± 12.86
Мочевина в моче, ммоль/л	Urine urea, mmol/L	103.41 ± 6.00	85.57 ± 6.01
Коэффициент ДНК-фрагментации по данным ПДАФ-теста на ядерных клетках крови крыс	DNA fragmentation coefficient according to AFLP test on rat nuclear blood cells	0.4240 ± 0.0005	<b>0.4446 ± 0.0005*</b>

Примечание. \* – величины, отличающиеся от соответствующих контрольных статистически значимо при  $p < 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Note. The sign \* marks the values that differ from the corresponding control values statistically significantly at  $p < 0.05$  according to Student's  $t$ -test with Bonferroni's correction.



**Рис. 3.** Соотношение НЛ/АМ в жидкости бронхоальвеолярного лаважа через 24 ч после интратрахеального введения крысам стерильной деионизированной воды или водной суспензии наночастиц оксида цинка.

**Fig. 3.** The NL / AM ratio in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 24h after the intratracheal instillation of suspension of ZnO nanoparticles or sterile deionized water to rats.

## Обсуждение

Как описано выше, содержание цинка в крови и выделениях у крыс контрольной группы оказалось ниже чувствительности метода определения, но было существенным у тех крыс, которые подвергались повторным внутрибрюшинным инъекциям суспензии ZnO-НЧ. Известно, что металло-оксидные НЧ, практически нерастворимые в водной суспензии, постепенно растворяются в биологических средах [18, 19]. Поэтому можно предположить, что это повышение содержания цинка и его элиминации из организма в определённой мере связано с резорбцией его ионов из брюшной полости в кровь.

Сканирующая трансмиссионная электронная микроскопия тканей селезёнки выявила однородные ультраструктурные изменения, наиболее частыми из которых являются повреждение митохондрий с частичной или полной потерей крист. Вместе с тем не вызывает сомнения и пенетрация в неё не растворившихся наночастиц, о чём свидетельствует обнаружение последних во внутренних органах, богатых клетками РЭС, в частности в селезёнке с токсическим повреждением ультраструктуры органа (рис. 4).

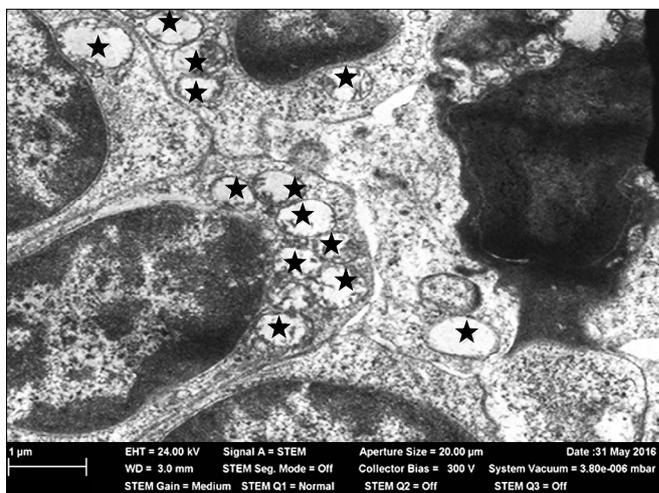
На STEM-изображениях можно увидеть наноразмерные электронно-плотные включения (рис. 5), которые отсутствуют в контроле и скорее всего являются введёнными внутрибрюшинно наночастицами. Степень повреждения митохондрий у контрольных и у экспонированных к ZnO-НЧ крыс статистически значимо различается как по степени повреждения, так и по доли повреждённых митохондрий.

Несмотря на это, общая картина субхронической интоксикации, развившейся в проведенном нами эксперименте (см. таблицу), может быть охарактеризована как умеренная, поскольку статистически значимые отличия от контроля наблюдались только по 10 показателям из 47. Отметим, в частности, снижение двигательной активности, которое (в совокупности с недостаточно значимым, но взаимосогласованным уменьшением числа заглядываний в «норки» и повышением СПП) свидетельствует о преобладании тормозных процессов в ЦНС. Несмотря на отсутствие каких-либо признаков анемии, значимо повышена (почти вдвое) доля ретикулоцитов. Наряду с этим повышено число тромбоцитов (а по тромбоцитру – статистически значимо) и лимфоцитов. Из биохимических показателей значимо снижены активность щелочной фосфатазы и альбуминов в сыворотке крови. Вместе с тем под влиянием ZnO-НЧ отмечено статистически значимое увеличение коэффициента фрагментации ДНК. Отметим, что этот важный неблаго-



**Рис. 4.** Селезёнка крысы, подвергавшейся воздействию наночастиц ZnO. В цитоплазме отмечается наличие электронно-плотных нановключений, разрушение митохондрий («звёздочки»), мембранное concentрическое включение с вакуолизацией цитоплазмы (стрелка). ПЭМ, увеличение  $\times 13\,420$ .

**Fig. 4.** Spleen of a rat exposed to ZnO nanoparticle. Cytoplasm contains electron-dense nanoinclusions, destruction of mitochondria (asterisks), membrane concentric inclusion with vacuolization of the cytoplasm (arrow). TEM, magnification  $\times 13,420$ .



**Рис. 5.** Селезёнка крысы, подвергавшейся воздействию наночастиц ZnO. В цитоплазме отмечается наличие электронно-плотных нановключений, значительное разрушение митохондрий («звёздочка»). ПЭМ, увеличение  $\times 11\,570$ .

**Fig. 5.** Spleen of a rat exposed to ZnO nanoparticles. The presence of electron-dense nanoinclusions is noted in the cytoplasm and significant destruction of mitochondria (asterisk). TEM, magnification  $\times 11,570$ .

приятный эффект наблюдался нами в аналогичных экспериментах со многими другими металл-содержащими наночастицами [20–22].

Для прогнозирования вредного цитотоксического действия ингалируемых ZnO-НЧ нами оценивалась реакция на их однократное интратрахеальное введение, где было замечено типичное действие для цитотоксических частиц, в том числе наноразмерных [23, 24], а именно усиление аттракции способных к их фагоцитозу клеток (особенно нейтрофильных лейкоцитов) в глубокие дыхательные пути и увеличение отложения нейтрофильных лейкоцитов к альвеолярным

макрофагам. Все оценённые нами биохимические характеристики были повышены во внеклеточной фракции бронхоальвеолярного лаважа, а статистически значимым это повышение является в отношении только активности аспарат-трансаминазы и амилазы.

## Заключение

На примере экспериментальной модели субхронической интоксикации к наночастицам оксида цинка было выявлено умеренно выраженное общетоксическое действие, которое проявлялось изменениями (статистически значимыми) только 10 из 47 (21%) изученных показателей. Изменение показателя коэффициента ДНК-фрагментации

по данным ПДАФ-теста, которое изучалось на ядерных клетках крови крыс, было статистически значимо повышено в сравнении с контрольной группой. С использованием электронной трансмиссионной микроскопии было показано повреждение митохондрий и накопление наночастиц цинка в ткани селезёнки.

При оценке цитотоксичности наночастиц цинка было выявлено 17-кратное увеличение показателя отношения НЛ/АМ, что говорит о высокой цитотоксичности этих частиц.

Полученные результаты позволяют повысить эффективность обоснования мер профилактики для работающих и населения, подвергающегося экспозиции к наночастицам цинка на производстве или через загрязнённую окружающую среду.

## Литература

(п.п. 1–3, 5, 10–14, 19–23 см. References)

- Хантурина Г.Р., Ибраева Л.К., Норцева М.А. Цитогенетические нарушения при интоксикации солями цинка и меди. *Современные наукоемкие технологии*. 2011; (3): 13–5.
- ВОЗ. Цинк: Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Женева; 2001.
- Божанова Т.П. Влияние свинца и других тяжелых металлов на здоровье детей. *Токсикологический вестник*. 1995; (5): 36–8.
- СанПиН 1.2.2353-08. Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности. М.; 2008.
- Моргалев Ю.Н., Гостева И.А., Моргалева Т.Г., Моргалев С.Ю., Костенко Е.В., Кудрявцев Б.А. Параметры эмбриогенеза рыб *Danio rerio* как индикаторы экологической токсичности наночастиц окиси цинка. *Российские нанотехнологии*. 2018; 13(5–6): 97–102.
- Розин М.А. *Определение некоторых временных характеристик сгибательного рефлекса задних конечностей животных. Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований*. Ленинград; 1954.
- Нарцисов Р.П. Применение п-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1969; 56(5): 85–91.
- Меньшиков В.В. *Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник*. М.; 1987.
- Зайцева Н.В., Землянова М.А., Степанков М.С., Игнатова М.А. Оценка токсичности и потенциальной опасности наночастиц оксида алюминия для здоровья человека. *Экология человека*. 2018; (5): 9–15. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-5-9-15>
- Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Дегтярёва Т.Д., Сутункова М.П., Ерёмченко О.С., Ходос М.Я. и соавт. Сравнительная оценка реакции альвеолярного фагоцитоза на интратрахеальное введение частиц магнетита (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) нано- и микрометрового диапазонов. *Медицина труда и промышленная экология*. 2010; (2): 12–6.
- Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world. *J. Nanopart. Res.* 2012; 14(9): 109–1120. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Xiao L., Liu C., Chen X., Yang Z. Zinc oxide nanoparticles induce renal toxicity through reactive oxygen species. *Food Chem. Toxicol.* 2016; 90: 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.02.002>
- Holmes A.M., Kempson I.M., Turnbull T., Paterson D., Robertsad M.S. Imaging the penetration and distribution of zinc and zinc species after topical application of zinc pyrithione to human skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018; 343: 40–7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.012>
- Khanturina G.R., Ibraeva L.K., Nortseva M.A. Cytogenetic disorders in intoxication with salts of zinc and copper. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. 2011; (3): 13–5. (in Russian)
- Subramaniam V.D., Prasad S.V., Banerjee A., Gopinath M., Murugesan R., Marotta F., et al. Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products. *Drug Chem. Toxicol.* 2019; 42(1): 84–93. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1491987>
- WHO. Zinc: Hygienic criteria for the state of the environment. Geneva; 2001.
- Bozhanova T.P. Influence of lead and other heavy metals on children's health. *Toksikologicheskii vestnik*. 1995; (5): 36–8. (in Russian)
- SanPiN 1.2.2353-08. Carcinogenic factors and basic requirements for the prevention of carcinogenic hazards. Moscow; 2008. (in Russian)
- Morgalev Yu.N., Gosteva I.A., Morgaleva T.G., Morgalev S.Yu., Kostenko E.V., Kudryavtsev B.A. Parameters of embryogenesis in zebrafish *Danio rerio* as indicators of the ecological toxicity of zinc oxide nanoparticles. *Rossiyskie nanotekhnologii*. 2018; 13(5–6): 311–6. <https://doi.org/10.1134/S1995078018030114> (in Russian)
- Babele P.K., Thakre P.K., Kumawat R., Tomar R.S. Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*. 2018; 213: 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.028>
- Wang C., Cheng K., Zhou L., He J., Zheng X., Zhang L., et al. Evaluation of long-term toxicity of oral zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2017; 178(2): 276–82. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0934-1>
- Minigalieva I.A., Katsnelson B.A., Panov V.G., Privalova L.I., Varaksin A.N., Gurvich V.B., et al. *In vivo* toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors. *Toxicology*. 2017; 380: 72–93. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.02.007>
- Poier N., Hochstoger J., Hackenberg S., Scherzad A., Bregenzer M., Schopper D., et al. Effects of zinc oxide nanoparticles in HUVEC: cyto- and genotoxicity and functional impairment after long-term and repetitive exposure *in vitro*. *Int. J. Nanomedicine*. 2020; 15: 4441–52. <https://doi.org/10.2147/ijn.s246797>
- International guiding principles for biomedical research involving animals. The Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council For Laboratory Animal Science; 2012.
- Rozin M.A. *Determination of Some Temporal Characteristics of the Flexion Reflex of the Hind Limbs of Animals. Reproduction of Diseases in Animals for Experimental Therapeutic Research [Opredelenie nekotorykh vremennykh kharakteristik sgitatel'nogo refleksa zadnikh konechnostey zhivotnykh. Vospriizvedenie zabolevaniy u zhivotnykh dlya eksperimental'no-terapevticheskikh issledovaniy]*. Leningrad; 1954. (in Russian)
- Nartsissov R.P. Application of n-nitrotetrazolium violet for quantitative cytochemistry of human lymphocyte dehydrogenases. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*. 1969; 56(5): 85–91. (in Russian)
- Men'shikov V.V. *Laboratory Research Methods in the Clinic: Handbook [Laboratornye metody issledovaniya v klinike: Spravochnik]*. Moscow; 1987. (in Russian)
- Zaytseva N.V., Zemlyanova M.A., Stepankov M.S., Ignatova M.A. Scientific forecasting of toxicity and evaluation of hazard potential of aluminum oxide nanoparticles for human health. *Ekologiya cheloveka*. 2018; (5): 9–15. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-5-9-15> (in Russian)
- Date A.A., Hanes J., Ensign L.M. Nanoparticles for oral delivery: design, evaluation and state-of-the-art. *J. Control. Release*. 2016; 240: 504–26. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.016>
- Minigalieva I.A., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Shur V.Ya., et al. Combined subchronic toxicity of aluminum (III), titanium (IV) and silicon (IV) oxide nanoparticles and its alleviation with a complex of bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(3): 837. <https://doi.org/10.3390/ijms19030837>
- Minigalieva I.A., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Shur V.Ya., et al. Attenuation of combined nickel (II) oxide and manganese (II, III) oxide nanoparticles' adverse effects with a complex of bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(9): 2555–83. <https://doi.org/10.3390/ijms160922555>
- Sutunkova M.P., Solovyeva S.N., Chernyshov I.N., Klinova S.V., Gurvich V.B., Shur V.Ya., et al. Manifestation of systemic toxicity in rats after a short-time inhalation of lead oxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(3): 690. <https://doi.org/10.3390/ijms21030690>
- Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Ya., Beikin Ya.B., et al. Some characteristics of free cell population in the airways of rats after intratracheal instillation of copper-containing nano-scale particles. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(11): 21538–53. <https://doi.org/10.3390/ijms151121538>
- Katsnel'son B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Eremenko O.S., Khodos M.Ya., et al. Comparative evaluation of the reaction of alveolar phagocytosis to the intratracheal administration of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) particles in the nano- and micrometer ranges. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2010; (2): 12–6. (in Russian)