

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ЧЁРНОЙ И ЦВЕТНОЙ МЕТАЛЛУРГИИ И ОЦЕНКА РИСКА ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ РАБОТАЮЩИХ

ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург

В статье обобщены основные результаты токсикологических экспериментов на крысах, проведённых путём: а) однократной интратрахеальной инстилляцией наночастиц серебра, золота, оксидов железа, меди, никеля, свинца, цинка и марганца в стабильных водных суспензиях без каких-либо химических добавок; б) повторных внутрибрюшинных введений, перечисленных наночастиц; в) хронической ингаляционной экспозиции к низкой концентрации наночастиц оксида железа. Найдено, что металлические и металлооксидные наночастицы значительно более токсичны как на клеточном, так и на органо-системном уровне по сравнению с микрометровыми и даже субмикронными частицами того же химического состава. Задержка и распределение металлических и металлооксидных наночастиц в организме управляются как физиологическими, так и физико-химическими процессами, зависят как от цитотоксичности, так и от растворимости в биосредах (присущей разным наночастицам в разной степени). Относительные вклады этих процессов в токсикокинетику различны для разных наночастиц, и конкретно для изученных в хроническом ингаляционном эксперименте частиц оксида железа, средний диаметр которых не превышает 20 нм и роль растворения преобладает. Впервые доказана высокая защитная активность макрофагального и нейтрофильного лёгочного фагоцитоза наночастиц, отложившихся в дыхательных путях, что указывает на принципиальную возможность безопасных уровней экспозиции к ним, но эти уровни должны быть намного ниже установленных для соответствующей микрометровой промышленной пыли.

Ключевые слова: *металлосодержащие наночастицы; токсичность; токсикокинетика; подходы к нормированию.*

Для цитирования: Сутункова М.П. Экспериментальное изучение токсического действия металлосодержащих наночастиц на предприятиях чёрной и цветной металлургии и оценка риска для здоровья работающих. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(12): 1182-1187. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-12-1182-1187>

Для корреспонденции: Сутункова Марина Петровна, канд. мед. наук, зав. лаб. токсикологии среды обитания ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: marinasutunkova@yandex.ru

Sutunkova M.P.

EXPERIMENTAL STUDIES OF TOXIC EFFECTS' OF METALLIC NANOPARTICLES AT IRON AND NONFERROUS INDUSTRIES AND RISK ASSESSMENT FOR WORKERS' HEALTH

The Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, 620014, Russian Federation

The paper summarizes main results of our toxicological "in vivo" experiments on white rats exposed to either a) a single intratracheal instillation of silver, gold, iron oxide, copper oxide, nickel oxide, manganese oxide, zinc oxide and lead oxide nanoparticles (NPs) in stable water suspensions without any chemical additives, b) repeated intraperitoneal injections the same NPs, c) low-level long-term inhalation exposure to the iron oxide nano-aerosol. We found these NPs to be much more noxious on both cellular and systemic levels as compared with their one micrometer or even submicron counterparts. The retention and distribution of metal and metal oxide NPs in the body are controlled by both physiological and physicochemical processes, depended on both cytotoxicity and solubility in biological milieus (inherent in different NPs to varying degrees). The relative contributions of these processes to the toxicokinetics are various for different NPs, and specifically for iron oxide particles of an average diameter not exceeding 20 nm, which were studied in the chronic inhalation experiment, the role of the dissolution predominates. Our data were first to testify to the high activity of the macrophagic and neutrophilic pulmonary phagocytosis of NPs deposited in airways. This fact suggests safe levels of exposure to airborne nanoparticles to be possible in principle but should be much lower if compared with established ones for respective micrometric industrial dust.

Key words: *metal-containing nanoparticles; toxicity; toxicokinetics; approaches to standard-setting.*

For citation: Sutunkova M.P. Experimental studies of toxic effects' of metallic nanoparticles at iron and nonferrous industries and risk assessment for workers' health. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(12): 1182-1187. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-12-1182-1187>

For correspondence: Marina P. Sutunkova, PhD, Head of the Laboratory of the Environment Toxicology of the Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Ekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: marinasutunkova@yandex.ru

Information about authors: Sutunkova M.P. <http://orcid.org/0000-0002-1743-7642>

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

Acknowledgment: The study had no sponsorship.

Received: 21 September 2017

Accepted: 25 December 2017

Искусственные наноматериалы стали за последние 10 – 12 лет одной из «горячих точек» в сфере исследований по безопасности труда (в том числе и экспериментально-токсикологических). Эти исследования имеют важнейшее значение в рамках оценки риска, создаваемого производством, на котором применяются такие материалы, а также потому, что частицы нанометрового диапазона (наночастицы (НЧ), или «ультратонкие» частицы) составляют существенную фракцию в аэрозольном загрязнении атмосферного воздуха и воздуха рабочих помещений ряда отраслей промышленности.

Среди проблем, решение которых необходимо для углубления теоретических основ оценки рисков для здоровья, связанных с производством и применением металлосодержащих наноматериалов и их гигиенического нормирования, наши исследования, проводившиеся с 2008 г., дали существенный вклад в обоснование ответов на следующие вопросы:

Распознаются ли НЧ физиологическими защитными механизмами хуже, чем соответствующие микрометровые частицы (МЧ)?

Являются ли НЧ более токсичными, чем МЧ, и если да, то имеется ли однозначная зависимость защитных и патологических реакций организма на действие НЧ от их размера в пределах условленного нанодиапазона и от химической природы нановещества?

Существует ли принципиальная возможность защиты здоровья людей, имеющих дело с искусственными наноматериалами или со спонтанно образующимися НЧ, путём установления жёстких, но практически осуществимых стандартов допустимой экспозиции [1–10]*.

Материал и методы

Наши эксперименты проводились с водными суспензиями сферических 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 (30 нм или 19 нм), оксида марганца Mn_2O_4 (32 нм или 20 нм), PbO (47 ± 16 нм) и палочковидными частицами ZnO с размерами $30 \pm 11 \times 83 \pm 20$ нм. Использовались не коммерческие наноматериалы, а специально приготовленные (в основном, с помощью лазерной абляции сверхчистых металлических пластинок) водные суспензии перечисленных металлов и оксидов с хорошо охарактеризованными свойствами. Все эксперименты были проведены на аутбредных белых крысах-самках из собственной колонии при начальной массе тела 150–220 г. Каждая экспонированная или контрольная группа включала не менее 12 особей. Крысы содержались в специальном помещении, отделённом от остальных помещений вивария, и получали чистую бутилированную воду и стандартный сбалансированный корм, хранимый отдельно от общих запасов. Эксперименты планировались и осуществлялись в соответствии с «International guiding principles for biomedical research involving animals developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences» (1985) и с одобрения Комиссии по этике нашего Центра.

Однократная интратрахеальная (и/т) инстилляция 1 мл суспензии (содержащей обычно 0,2 мг вещества, но иногда в большей дозе) 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).

Та же самая экспериментальная техника давала при центрифугировании жидкости, полученной через 24 ч после и/т инстилляций при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ), клеточный материал для оптической, просвечивающей электронной (ПЭМ) и полуконтактной атомносиловой микроскопии (пкАСМ) с целью изучения фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов (АМ) и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), а также внутриклеточной локализации частиц и вызываемых ими ультраструктурных повреждений клеток.

* Все исследования, обобщаемые в этой статье, проводились в отделе токсикологии и биопротекции ФБУН ЕМНЦПОЗРП, руководимом заслуженным деятелем науки РФ профессором Б.А. Кашельсоном, при участии соавторов этих публикаций, названных в списке литературы.

Вместе с тем, анализ количественных особенностей отложения НЧ в глубоких дыхательных путях, их длительной задержки в лёгких, перераспределения между другими органами и выведения из организма при прерывистой ингаляционной экспозиции в течение значительной части жизни, наиболее важной с позиций промышленной токсикологии и гигиены труда, требовал проведения соответствующего хронического ингаляционного эксперимента. Для такого эксперимента использовалась автоматизированная установка типа «только нос» фирмы CN Technologies (США) с ограничивающими подвижность животного пеналами («крестейнерами») для 60 крыс, которая обеспечивала:

– поступление вещества в организм только через органы дыхания (то есть не допускала загрязнения им поверхности тела с последующим слизыванием с неё и возможной транскутанной пенетрацией в кровь);

– равномерность экспозиции всех животных подопытной группы;

– стабильность экспозиции в течение ингаляционного периода.

Этим условиям отвечала ингаляционная система типа «только нос» с автоматической регулировкой всех параметров экспозиции. Аналогичная установка без генератора частиц использовалась для квази-экспозиции контрольных крыс.

Витающие НЧ со средним диаметром 14 ± 4 нм генерировались с помощью электрического искрения между стержнями железа 99,99% чистоты в атмосфере азота, разбавлялись увлажнённым воздухом с окислением до Fe_2O_3 . Ингаляционная экспозиция крыс проводилась по 4 ч в день 5 раз в неделю на протяжении 3, 6 и 10 мес при средней для всего 10-месячного периода концентрации Fe_2O_3 (достаточно однородной по всем ярусам ингаляционной установки), равной $1,14 \pm 0,02$ мг/м³. Крысы умерщвлялись на следующий день после завершающей экспозиции.

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

При введении в организм металлов как в интраперитонеальных, так и в ингаляционном экспериментах содержание в органах и в выделениях определяли с помощью атомной эмиссионной или абсорбционной спектроскопии, а в случае введения железа, никеля и марганца – с помощью электронного парамагнитного резонанса.

Тонкие срезы фиксированных органов готовились для гистологического исследования при окраске гематоксилином-эозином, а при необходимости также методами ШИК, Ниссля и Перлса. Окулярная планиметрическая сетка Автандилова использовалась для морфометрии изменений в печени и селезёнке, а программа распознавания образов CellSens (Olympus, ФРГ) – для изменений в почках и головном мозге. В субхронических интраперитонеальных экспериментах, а также в хроническом эксперименте с оксидом железа оценивалась фрагментация генетической ДНК в клетках различных тканей с помощью ПДАФ-теста.

Результаты и обсуждение

Далее основные результаты наших исследований рассмотрены в свете тех вопросов, которые были поставлены выше.

Распознаются ли НЧ физиологическими защитными механизмами хуже, чем соответствующие МЧ?

Практическая значимость этого вопроса состоит в том, что если эти механизмы защиты от НЧ малоэффективны, то безвредные уровни экспозиции к последним едва ли возможны в принципе. В то же время многими авторами предполагалось, что те защитные механизмы, которые дают животному организму возможность нормально существовать в земной атмосфере, неизбежно загрязнённой взвешенными частицами широкого диапазона размеров и разного химического состава, по тем или иным причинам малоэффективны или вообще неэффективны по отношению к НЧ [11, 12]. В частности, утверждалось, что НЧ, отложившиеся в пульмонарной области респираторного тракта, не могут эффективно фагоцитироваться АМ то ли потому, что эти клетки не способны распознать НЧ из-за их крайне малых размеров, то ли из-за неспособности самих НЧ генерировать

Число клеток в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) у крыс через 24 ч после интратрахеальной инстилляцией 0,2 мг НЧ золота или нано-, или микро-частиц серебра ($x \pm s$)

Введённое вещество	Число клеток *106			НЛ/АМ
	всех клеток	НЛ	АМ	
НЧ золота (50 нм)	2,30 ± 0,93	0,63 ± 0,15*	0,94 ± 0,09	0,63 ± 0,13*
НЧ серебра (49 нм)	4,25 ± 0,77●	2,99 ± 0,71*●	1,16 ± 0,14	2,47 ± 0,33*●
МЧ серебра (1,1 мкм)	1,99 ± 0,25	0,73 ± 0,15*	1,24 ± 0,19	0,66 ± 0,13*
Вода без частиц	1,41 ± 0,33	0,13 ± 0,04	0,89 ± 0,18	0,14 ± 0,023

Примечание. Статистически значимо отличается: * – от контрольной группы; ● – от группы, получившей МЧ серебра; ● – от группы, получившей НЧ золота ($p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента).

хемотактический сигнал. Известно, что авторитетная группа исследователей утверждала, что «очень маленькие частицы не могут быть детектированы нормальными фагоцитарными механизмами защиты», и даже позднее не считался решённым вопрос о том, «узнаются ли НЧ фагоцитами или пролетают под радаром и избегают иммунного распознавания» [12, 13].

Наши собственные данные свидетельствуют о том, что организм вовсе не беззащитен по отношению к металлосодержащим НЧ. В частности, в большом числе экспериментов мы нашли, что лёгочная фагоцитарная реакция на отложение таких 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 (табл. 1). К тому же этот сдвиг и, в особенности, увеличение числа НЛ с увеличением счётного отношения НЛ/АМ тем более выражены, чем мельче частицы в пределах нанометрового диапазона.

Такая мобилизация НЛ на свободную поверхность дыхательных путей в ответ на отложение в них любых частиц, в том числе наноразмерных, нередко описывается как «воспаление», то есть рассматривается скорее как патологический феномен, чем как защитный механизм [14]. Мы полагаем, что такой взгляд может быть дезориентирующим. Вне всяких сомнений, эта мобилизация типична для острых и, в меньшей степени, хронических респираторных воспалений микробной или химической этиологии. Однако определённое число НЛ всегда присутствует в БАЛЖ даже молодых крыс, постоянно дышащих не отфильтрованным окружающим воздухом, считать которых большими хроническим воспалением лёгких нет серьёзных оснований. С другой стороны, в экспериментах и при математическом моделировании уже давно были представлены убедительные доказательства того, что усиление мобилизации НЛ является важным механизмом частичной компенсации повреждения, нанесённого цитотоксичными МЧ основному, а именно макрофагальному механизму их лёгочного клиренса [15].

В дальнейшем наши эксперименты подтвердили, что сказанное ещё более справедливо для частиц нанометрового диапазона, и что усиленный приток НЛ, будь это элемент воспаления или нормальная защитная реакция, играет важнейшую роль в самоочищении лёгких от НЧ. Необходимо подчеркнуть, что оба фактора фагоцитарного механизма этого самоочищения, то есть АМ и НЛ, могут быть нагружены наночастицами в значительно большей степени, чем соответствующими МЧ в параллельно проведённом эксперименте. При этом, чем мельче действующие НЧ, тем более жадно они поглощаются клетками обоих типов [1–10].

При заданном же диаметре наночастиц сравнительная интенсивность фагоцитарной реакции лёгких на их отложение и активность поглощения частиц фагоцитами предопределяются их химической природой, что было показано, например, при параллельном сопоставлении НЧ серебра и золота или НЧ оксидов никеля и марганца [1, 3]. От химической же природы НЧ зависят 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 пкАСМ выявила впервые описанные нами многочисленные «ямки» на поверхности как АМ, так и НЛ. Чем мельче вводившиеся интратрахеально частицы, тем меньше средний диаметр этих ямок 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 прохождения частицы через клеточную мембрану, а зафиксированным на определённый момент времени следом её инвагинации в процессе активного эндоцитоза (фагоцитоза) частицы. ПЭМ выявляет именно такую инвагинацию клеточной мембраны с отделением эндосомы (фагосомы), что также свидетельствует об активном эндоцитозе этих НЧ как, по меньшей мере, одним из механизмов их проникновения внутрь клетки [5].

Положительная ранговая корреляция между показателями НЛ/АМ и фагоцитарной активностью клеток, измеренная числом «ямок», была показана также в экспериментах с НЧ серебра и золота и с медно-оксидными НЧ [3, 7].

Таким образом, в серии взаимно подтверждающих экспериментов с интратрахеальным введением разных металлосодержащих НЧ мы показали, что как мобилизация фагоцитирующих клеток (АМ, но в особенности НЛ) на свободную поверхность глубоких дыхательных путей, так и фагоцитарная активность единичной клетки при отложении наночастиц значительно выше, чем при отложении даже мельчайших микрочастиц того же состава, причём оба процесса тем более интенсивны, чем меньше диаметр НЧ, но зависят также от химической природы нановещества.

К этому следует добавить, что, как показано в экспериментах с наномангнетитом, лёгочная ткань освобождается от МЧ и НЧ тем быстрее, чем они мельче. Причиной этого, по-видимому, является как более активный фагоцитарный механизм её самоочищения, так и большая растворимость НЧ, меньших по размеру и потому имеющих более высокую удельную поверхность. Ясно, однако, что как физиологический, так и физико-химический механизм самоочищения лёгких от НЧ (с перемещением их в ЖКТ или напрямую в кровь), ослабляя токсическое повреждение ими этого органа, создают предпосылки к системной токсичности нановещества. Вместе с тем, как показано нами при хронической ингаляционной экспозиции к Fe_2O_3 – НЧ или к SiO_2 – НЧ, относительно высокая биорастворимость этих НЧ обуславливает низкую задержку их не только в лёгких, но и в других внутренних органах, что при высокой цитотоксичности может существенно ослабить токсичность на органо-системном уровне [9, 10].

Являются ли НЧ более токсичными, чем МЧ, и если да, то имеется ли однозначная зависимость защитных и патологических реакций организма на действие НЧ от их размера в пределах условленного нанодиапазона и от химической природы нановещества?

То, что переход вещества в наносостояние неизбежно делает его значительно более токсичным, вначале утверждалось лишь на основании теоретических соображений [11, 12]. Однако очень скоро в ряде исследований были получены и некоторые экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу, но это подтверждение в течение определённого периода не было ни общепризнанным, ни абсолютно надёжным ввиду методических дефектов и плохой сопоставимости дизайна разных экспериментов.

Практически ничего не было известно о сравнительной токсичности химически идентичных НЧ, различающихся по размеру *внутри* условленного нанодиапазона (от единиц до 100 нм), и недостаточно ясным было, имеет ли наноразмерность как таковая большее значение, чем химическая идентичность частицы?

Но довольно быстро была накоплена совокупность фактов, позволяющая сегодня утверждать, что при совпадающих условиях экспозиции и сходной химической природе токсическое действие металлических и металлооксидных НЧ, как правило, намного сильнее действия даже наименьших частиц в микрометровом диапазоне (включая субмикронные) и что при заданных размерах НЧ сила и отчасти характер этого действия зависят от их химической природы и связанных с нею свойств, вклю-

чая растворимость. Наряду с растворимостью, проявляющейся релизом ионов металла внутри клетки, куда он попадает в составе пенетрирующей или фагоцитируемой НЧ (так называемый «эффект Троянского коня»), вторым широко признанным первичным механизмом цитотоксичности и, особенно, генотоксичности, общим для практически всех пока изученных металлосодержащих НЧ, является индуцированное ими образование свободных радикалов [16].

Токсическое действие изученных нами НЧ именно на лёгочные фагоциты особо интересно не только потому, что оно неблагоприятно влияет на функцию этих клеток в процессе самоочищения лёгких 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 АМ, является механизмом частичной компенсации того разрушения макрофагов, которое вызывается цитотоксическим действием фагоцитируемых частиц. Было уже давно найдено, что такое усиление мобилизации как новых АМ, так и НЛ контролируется массой образовавшихся продуктов разрушения макрофагов (ПРМ) и особенно их липидной фракции [15]. Поэтому, чем более цитотоксичны для АМ частицы, отложившиеся в пульмонарной области (или чем выше введенная и/т доза ПРМ, полученных асептически путём замораживания-оттаивания или ультразвукового разрушения неактивированных перитонеальных макрофагов), тем выше отношение НЛ/АМ в полученной затем БАЛЖ. Этим обусловлено значение данного отношения как косвенного, но высокоинформативного сравнительного показателя цитотоксичности частиц.

Используя этот показатель, мы продемонстрировали (см. табл. 1), что металлосодержащие НЧ значительно более цитотоксичны, чем МЧ того же металла, причём эта цитотоксичность тем выше, чем мельче НЧ.

Подобного рода результаты, полученные и с другими НЧ, не являются артефактом интратрахеальной модели отложения частиц в глубоких дыхательных путях, поскольку на примере НЧ оксида железа мы показали значимое увеличение показателя НЛ/АМ и при ингаляционном воздействии (табл. 2).

Однако при заданном размере величина индекса цитотоксичности НЛ/АМ зависит от химической природы НЧ. Так, при параллельном тестировании показано (см. табл. 1), что наносеребро намного более цитотоксично, чем нанозолото. Подобным же образом показано, что данный индекс после интратрахеального введения НЧ оксида никеля (NiO) значимо выше, чем после введения той же дозы равноразмерных НЧ оксида марганца (Mn₂O₃): 1,20 ± 0,3 и 0,67 ± 0,3 (в контроле 0,06 ± 0,01; *p* < 0,05) [1]. В другом исследовании [8] мы нашли, что цитотоксичность, оценённая как по индексу НЛ/АМ при и/т введении, так и по степени повреждения митохондрий в клетках внутренних органов при субхронической и/п экспозиции убывает в порядке ZnO – НЧ > PbO – НЧ > CuO – НЧ.

То, что ультраструктурные изменения клетки, обнаруживаемые при ПЭМ, также не одинаковы при действии разных металлов, было показано и в других наших экспериментах. Например, НЧ серебра вызывают значительно более выраженное повреждение митохондриальных мембран и крист в клетках БАЛЖ, а НЧ оксида меди – то же по сравнению с субмикронными частицами, имеющими ядро металлической меди, покрытое меднооксидным слоем [1, 4–7]. Неодинаковая растворимость, показанная нами при инкубации этих НЧ в модельных средах (надосадочной БАЛЖ или сыворотке крови), является одним из возможных объяснений их неодинаковой цитотоксичности, включая митотоксичность. Другое объяснение, а именно неодинаковая способность разных металлов к запуску внутриклеточной генерации ROS, приводящей к так называемому оксидативному стрессу, хорошо известна, но в наших собственных экспериментах не исследовалась [16].

Число клеток в жидкости, полученной при БАЛЖ у крыс через 24 ч после завершающей ингаляционной экспозиции к нанозолоту оксида железа Fe₂O₃ (x ± sx)

Общая продолжительность экспозиционного периода, мес	Группа крыс	Число клеток *106			НЛ/АМ
		всех клеток	НЛ	АМ	
3	экспонированная	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	
6	экспонированная	2,45 ± 0,40	1,96 ± 0,28*	0,48 ± 0,14*	0,23 ± 0,04*
	контрольная	2,34 ± 0,40	2,20 ± 0,32	0,14 ± 0,03	

Примечание. Статистически значимо отличается: * – от контрольной группы; ° – от экспонированной группы предыдущего срока (*p* < 0,05 по *t*-критерию Стьюдента).

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 объяснить тем, что ПРМ 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 [15].

Соотношение между размерами частиц и их токсичностью на органно-системном уровне оказалось не столь однозначным, как на клеточном. Например, субхроническая токсичность НЧ магнетита хотя и оказалась более высокой по сравнению с токсичностью 1-микронных МЧ, однако в пределах 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 селезёнки [2]. Некоторые морфометрические характеристики гистологических срезов печени свидетельствовали о более высоком 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 (табл. 3).

Этот парадокс связан с тем, что, как было показано в тех же экспериментах, оба названных органа накапливали НЧ диаметром 50 нм в большей массе, чем НЧ диаметром 10 нм.

В свою очередь, это может быть объяснено 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 между этими противона-

Таблица 3

Некоторые морфометрические характеристики гистологической картины печени при субхронической экспозиции крыс к частицам магнетита разного размера (x ± s.e)

Число на 100 клеток печени	Группы крыс			
	контрольная	экспонированные к частицам магнетита диаметром		
		10 нм	50 нм	1 мкм
Безъядерные гепатоциты	13,1 ± 0,9	37,0 ± 1,6*●■	44,4 ± 1,3*■	19,6 ± 1,7*
Двухъядерные гепатоциты	5,1 ± 0,5	2,3 ± 0,3*■	2,0 ± 0,3*■	6,1 ± 0,6
Клетки Купфера	27,2 ± 1,6	31,8 ± 2,0●	19,2 ± 3,3■	33,2 ± 0,4*

Примечание. Статистически значимо отличается: * – от контрольной группы; ● – от группы «50 нм»; ■ – от группы «1 мкм» (*p* < 0,05 по *t*-критерию Стьюдента).

Коэффициент фрагментации ядерной ДНК (ПДФ-тест) в клетках разных органов у крыс при субхроническом внутрибрюшинном воздействии равноразмерных НЧ серебра или золота ($x \pm sx$)

Группы крыс при воздействии:	Ткань				
	печень	костный мозг	селезёнка	почка	ядерные клетки крови
Воды (контроль)	0,399±0,001	0,385±0,003	0,379±0,002	0,385±0,003	0,383±0,001
Нанозолота (НЗ)	0,392±0,010°	0,412±0,014*	0,397±0,008°	0,422±0,009*	0,403±0,018
Наносеребра (НС)	0,461±0,002 *	0,455±0,032*	0,462±0,001*	0,423±0,008*	0,413±0,012*

Примечание. Статистически значимо отличается: * – от контрольной группы; ° – от группы, получавшей наносеребро ($p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента).

правленными токсикокинетическими механизмами зависит от конкретных размеров и скоростей растворения частиц. Отметим, что уже при диаметре 1 мкм частицы магнетита в печени и селезёнке практически не обнаруживаются, а это может быть объяснено их малой способностью к диффузионной пенетрации через серозную оболочку брюшной полости в кровь.

При равном размере НЧ накопление металлов в органах, скорее всего контролируется сравнительной растворимостью и сравнительной цитотоксичностью, определяемыми химической природой металла. Так, при субхронической загрузке равноразмерными НЧ серебра и золота, более растворимое и более цитотоксичное наносеребро накапливалось и в печени ($0,12 \pm 0,01$ мг на г сухой массы), и в селезёнке ($0,40 \pm 0,04$ мг) в меньшем количестве, чем нанозолото (соответственно, $0,20 \pm 0,02$ мг и $0,50 \pm 0,1$ мг; по печени разница значима при $p < 0,01$) [3]. Напротив, те же самые различия растворимости 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, $0,26 \pm 0,09$ мг и $0,010 \pm 0,001$ мг на 1 г сухой массы ($p < 0,05$).

При аналогичном сравнительном изучении субхронической токсичности NiO – НЧ и Mn_3O_4 – НЧ было найдено, что марганец-оксидные НЧ растворяются в биологической среде (моделируемой сывороткой бычьей крови) намного быстрее, чем никель-оксидные. Этим и можно объяснить то, что накопления Mn_3O_4 не было обнаружено методом ЭПР даже в органах, богатых РЭС.

Всеми нашими экспериментами показано, что химическая природа НЧ определяет различия не только их цитотоксичности, но и органо-системной токсичности, а также полиорганной генотоксичности, впервые в нанотоксикологии, насколько нам известно, исследовавшейся нами на организменном уровне [1–10]. Отметим, однако, что более высокая генотоксичность серебра по сравнению с золотом, найденная в печени, селезёнке, костном мозге и крови, не проявилась в почке (табл. 4).

Это можно объяснить не только показанным выше меньшим накоплением в ней серебра по сравнению с золотом, но и значительно более выраженным, судя по морфометрическим показателям, токсическим повреждением тубулярного эпителия вплоть до клеточного некроза, что маскирует генотоксический эффект [3]. Такая гипотеза находит подтверждение в экспериментах с медно-оксидными НЧ, которые ещё более растворимы и ещё более нефротоксичны, чем НЧ серебра [6]. В этом случае почки оказались единственным органом, в котором коэффициент фрагментации ДНК вообще не был повышен по сравнению с контролем.

Существует ли принципиальная возможность установления жёстких, но практически осуществимых стандартов допустимой экспозиции к металлосодержащим наночастицам?

Для любых потенциально вредных веществ установление подобных стандартов, 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 стохастических вредных эффек-

тов над фоновым уровнем. Экспериментальные данные, обобщённые выше, позволяют утверждать, что организм не беззащитен и по отношению к металлосодержащим НЧ.

С другой стороны, наши данные подтверждают преобладающие представления, согласно которым вещество, даже относительно безвредное и мало опасное в обычном состоянии (подобно оксидам железа), может оказаться выражено токсичным в нано-состоянии, а те вещества, вредное действие которых на организм несомненно и в виде частиц микрометрового диапазона, составляющих

преобладающую часть массы промышленных 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 всё же более высокой по сравнению с даже мельчайшими частицами микрометрового диапазона.

Из вышесказанного следует, что:

- в принципе установление нормативов типа ПДК или ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) для содержания НЧ в воздухе рабочих помещений не менее оправданно, чем для содержания МЧ;
- такие нормативы должны быть существенно ниже установленных для МЧ той же химической природы;
- на данном этапе НЧ могут нормироваться без подразделения по субфракциям разных размеров.

Выводы

1. По меньшей мере, один из ключевых защитных механизмов при воздействии НЧ на лёгкие (фагоцитарная реакция) не только не менее, как ранее предполагалось, но даже более активен, чем при воздействии микрочастиц. Это указывает на принципиальную возможность установления допустимых уровней загрязнения воздуха металлосодержащими НЧ, однако эти уровни должны быть значительно ниже тех, которые приняты для соответствующих микрочастиц.

2. Наряду с этим физиологическим механизмом токсикокинетика НЧ на органном (в первую очередь, лёгочном) и организменном уровнях контролируется их способностью к пенетрации в кровь и лимфоток, а также различной для разных металлов, но достаточно выраженной растворимостью в биологических средах.

3. Изученные нами металлосодержащие наночастицы обладают более выраженным вредным действием как на клеточном, так и на органо-системном уровне по сравнению даже с мельчайшими микрочастицами соответствующего химического состава. Вместе с тем, в пределах условленного нанодиапазона связь органо-системной токсичности с размером частицы является неоднозначной, что определяется сложными и нередко противонаправленными зависимостями между этим размерами, первичными механизмами биологической агрессивности НЧ и токсикокинетикой НЧ.

4. При равных размерах как интегральная, так иногда и специфическая токсичность наночастиц зависит от их химической природы и связанных с нею физических и физико-химических характеристик, включая растворимость.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература (п.п. 2-16 см. References)

1. Кацнельсон Б.А., Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Сутункова М.П., Гурвич В.Б., Шур В.Я. и др. Реакция глубоких дыхательных путей крысы на однократное интратрахеальное введение наночастиц оксидов никеля и марганца или их комбинации и её ослабление биопротекторной премедикацией. *Токсикологический Вестник*. 2014; (6): 8-14.

References

- Katsnel'son B.A., Minigalieva I.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurchich V.B., Shur V.Ya., et al. Lower airways response in rats to a single or combined intratracheal instillation of manganese and nickel nanoparticles and its attenuation with a bio-protective pre-treatment. *Toxikologicheskii Vestnik*. 2014; (6): 8-14. (in Russian)
- Katsnelson B.A., Degtyareva T.D., Minigalieva I.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Yeremenko O.S., et al. Sub-chronic systemic toxicity and bio-accumulation of Fe₃O₄ nano- and microparticles following repeated intraperitoneal administration to rats. *Int. J. Toxicol.* 2011; 30(1): 60-7.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurchich V.B., Makeyev O.H., Shur V.Y., Beikin J.B., et al. Comparative in vivo assessment of some adverse bio-effects of equidimensional gold and silver nanoparticles and the attenuation of nanosilver's effects with a complex of innocuous bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 2(14): 2449-83.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., et al. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: Are we defenseless against nanoparticles? *Int. J. Occup. Environ. Health.* 2010; 4(16): 508-24.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Khodos M.Y., Shur V.Y., Shishkin E.I., et al. Uptake of some metallic nanoparticles by, and their impact on pulmonary macrophages in vivo as viewed by optical, atomic force, and transmission electron microscopy. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2012; 3: 1-8.
- Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurchich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E., et al. Subchronic Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles and Its Attenuation with the Help of a Combination of Bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(7): 12379-406.
- Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurchich V.B., Shur V.B., Beikin Y.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.
- Minigalieva I.A., Katsnelson B.A., Panov V.G., Privalova L.I., Varaksin A.N., Gurchich 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.
- Sutunkova M.P., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurchich V.B., Konyshova L.K., Shur V.B., et al. On the contribution of the phagocytosis and the solubilization to the iron oxide nanoparticles retention in and elimination from lungs under long-term inhalation exposure. *Toxicology*. 2016; 363: 19-28.
- Sutunkova M.P., Solovyeva S.N., Katsnelson B.A., Gurchich V.B., Privalova L.I., Minigalieva I.A., et al. A paradoxical response of the rat organism to long-term inhalation of silica-containing submicron (predominantly nanoscale) particles of a collected industrial aerosol at realistic exposure levels. *Toxicology*. 2017; 384: 59-68.
- Donaldson K., Stone V., Tran C.K., Kreyling W., Borm P.J. Nanotoxicology (Editorial). *Occup. Environ. Med.* 2004; 61(9): 727-8.
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studied of ultrafine particles. *Environ. Health Persp.* 2005; 113(7): 823-39.
- Fadeel B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med. Wkly.* 2012; 142: w13609.
- Sager T.M., Porter D.W., Robinson V.A., Lindsley W.G., Schwegler-Berry V.A., Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicol.* 2007; 1(2): 118-29.
- Privalova L.I., Katsnelson B.A., Osipenko A.B., Yushkov B.H., Babushkina L.G. 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. *Environ. Health Perspect.* 1980; 35: 205-18.
- Fröhlich E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *J. Curr. Drug Metab.* 2013; 14(9): 976-88.

Поступила 21.09.17
Принята к печати 25.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 613.63:616-084

Привалова Л.И.¹, Кацнельсон Б.А.¹, Минигалиева И.А.¹, Сутункова М.П.¹, Макеев О.Г.², Валамина И.Е.², Шур В.Я.³, Клинова С.В.¹, Соловьёва С.Н.¹

БИОПРОФИЛАКТИКА В СИСТЕМЕ УПРАВЛЕНИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМИ РИСКАМИ, СВЯЗАННЫМИ С ВОЗДЕЙСТВИЕМ МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ

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

²ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», 620109, Екатеринбург;

³ФГАОУ ВПО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, Екатеринбург

Широкое распространение нанотехнологий и существенный вклад наноразмерной фракции в аэрозоли, образующиеся при многих пирометаллургических и электросварочных технологиях при доказанной многими исследованиями высокой биологической агрессивности металлических и металло-оксидных наночастиц, обуславливают актуальность поиска путей повышения устойчивости организма к их вредному действию. В серии исследований показано, что на фоне приёма комбинаций некоторых биологически активных веществ, подобранных исходя из теоретических предпосылок, накопленного опыта и назначаемых в безвредных дозах, интегральные и специфические проявления органо-системной токсичности и даже генотоксичности металлосодержащих наночастиц могут быть заметно ослаблены. Дальнейшее развитие этих исследований с практическим внедрением результатов является одним из перспективных направлений стратегии управления профессиональными рисками.

Ключевые слова: металлосодержащие наночастицы; биопротекторы.

Для цитирования: Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А., Минигалиева И.А., Сутункова М.П., Макеев О.Г., Валамина И.Е., Шур В.Я., Клинова С.В., Соловьёва С.Н. Биопрофилактика в системе управления профессиональными рисками, связанными с воздействием металлосодержащих наночастиц. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(12): 1187-1191. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-12-1187-1191>

Для корреспонденции: Привалова Лариса Ивановна, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. научных основ биологической профилактики отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: privalovali@yahoo.com