

На правах рукописи

Сутункова Марина Петровна

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

14.02.01 – гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Пермь – 2019

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,
Гурвич Владимир Борисович

доктор медицинских наук, профессор
Кацнельсон Борис Александрович

Официальные оппоненты:

Чащин Валерий Петрович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий научно-исследовательской лабораторией комплексных проблем гигиены и эпидемиологии

Хамидулина Халидя Хизбулаевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор

Радилов Андрей Станиславович, доктор медицинских наук, профессор, лауреат Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники, Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, исполняющий обязанности директора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 20__ г. в _____ часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.128.02 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26).

С диссертацией можно ознакомиться на сайте www.fcrisk.ru ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» и в библиотеке ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26), с авторефератом на сайтах www.fcrisk.ru и www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Землянова Марина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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

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

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

Поэтому для углубления теоретических основ оценки риска для здоровья, связанных со свойствами наночастиц, производством и применением металлосодержащих

наноматериалов, а также с образованием соответствующих НЧ и их гигиенического нормирования, изучение токсичности металлсодержащих НЧ является особо важным (Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О., 2010; Онищенко Г.Г., 2011; Филатов Б.Н. и соавт., 2015; Радилов А.С. и соавт., 2016; Леоненко Н.С., 2016, De Matteis V. et al., 2019).

Степень разработанности темы исследования

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

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

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

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

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

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

В 1991 г была создана многокамерная модель кинетики задержки практически нерастворимых полидисперсных частиц в легких и региональных лимфоузлах, которая многократно использовалась в исследованиях и хорошо зарекомендовала себя при описании особенностей кинетики ряда цитотоксичных пылей при различных сопутствующих факторах (Привалова Л.И. с соавт., 1990; Katsnelson V.A. et al., 1992; 1994; 1997). Однако данная модель не учитывает ряд особенностей кинетики частиц наноразмерного диапазона, таких как

влияние дисперсности НЧ на накопление в органах и тканях, влияние растворимости НЧ в биожидкостях на их кинетику, способность НЧ к прямой пенетрации из мест первичного отложения в кровоток с последующей задержкой во внутренних органах, в особенности в органах, богатых клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), в частности, в селезенке и печени.

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

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

Работа одобрена Локальным независимым этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Оценить в токсиколого-гигиенических исследованиях наиболее общие закономерности вредного действия на организм наночастиц и влияние их химической природы, размера, растворимости (в том числе в пределах нанометрового диапазона) на биологическую агрессивность на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях;
2. Рассмотреть общие принципы гигиенической регламентации металлсодержащих наночастиц на основании проведенных экспериментальных исследований;
3. Рассмотреть использование метода экстраполяции и интерполяции с имеющим норматив микрометровым аналогом по химической природе применительно к гигиенической

регламентации наночастиц на основании сравнительной оценки реагирования защитно-компенсаторных механизмов организма;

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

5. Обосновать среднесменную предельно допустимую концентрацию наночастиц диоксида железа в воздухе рабочей зоны по результатам хронического ингаляционного эксперимента;

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

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

Научная новизна

Обосновано использование в гигиенической оценке для регламентации металлсодержащих наночастиц таких их свойств как размер, химическая природа, растворимость в биологических средах и способность к пенетрации через биологические мембраны, от которых зависит цитотоксичность наночастиц, реакция на отложение в легких, распределение внутри фагоцитоспособных клеток, интенсивность токсического действия, включая генотоксичность.

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

Впервые дана характеристика реакции альвеолярного фагоцитоза с помощью оптической, электронной, полуконтактной атомно-силовой микроскопии, биохимического исследования на отложение в глубоких дыхательных путях некоторых металлических и/или

металлооксидных наночастиц и доказана ее высокая защитная активность. Впервые доказано, что изменение топографии поверхности альвеолярных макрофагов (образование «вдавлений») отражает стадию инвагинации клеточной мембраны как первую фазу фагоцитоза микро- и наночастиц и может служить информативным показателем активности этого защитного механизма.

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

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

Теоретическая и практическая значимость

Углублены и развиты теоретические представления в гигиенической науке, отражающие общие и частные особенности и механизмы токсического действия наночастиц, разработана система критериев токсиколого-гигиенических оценок, методология гигиенического анализа риска здоровью при воздействии металлосодержащих частиц нанодиапазона в условиях производственной среды. Особенности этого токсического действия, должны учитываться при уточненной оценке риска для здоровья рабочих металлургических производств. Обосновано использование в качестве ускоренного скринингового метода сравнительной оценки токсического действия наночастиц *in vivo* по количественной характеристике реакции глубоких дыхательных путей на отложение частиц по цитологическим и биохимическим показателям жидкости, получаемой при бронхоальвеолярном лаваже. Обоснована среднесменная предельно допустимая концентрация наночастиц диоксида железа $0,4 \text{ мг/м}^3$, нахождением так называемой пороговой (то есть близкой к минимально действующей) концентрации наночастиц в хроническом ингаляционном эксперименте.

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

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Доказана принципиальная возможность установления безопасных уровней воздействия металлосодержащих наночастиц на организм по результатам проведенных токсиколого-гигиенических исследований;

2. Разработана методология обоснования этих уровней на основании экспериментальной оценки и анализа зависимости цитотоксических, токсических и генотоксических эффектов металлических и металлооксидных наночастиц *in vivo* от их физико-химических характеристик;

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

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

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

Внедрение результатов исследования

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

Материалы диссертационного исследования использованы при оформлении результатов интеллектуальной деятельности:

- «Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наносеребра на организм» (патент на изобретение Российской Федерации № 2530639);
- «Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наночастиц оксида меди на организм» (патент на изобретение Российской Федерации № 2560682);
- «Способ повышения устойчивости организма к комбинированному токсическому действию наночастиц оксидов меди, цинка и свинца» (патент на изобретение Российской Федерации № 2642674);

- «Схема многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной области» (патент на промышленный образец Российской Федерации № 100783);
- Схема «Структура многокамерной модели кинетики распределения и задержки в организме металлсодержащих наночастиц, отложившихся в глубоких дыхательных путях» (патент на промышленный образец Российской Федерации № 105244)

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

Результаты исследований используются в практической деятельности учреждений Роспотребнадзора в Свердловской области в системе социально-гигиенического мониторинга;

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

Материалы исследований представлены на 28 конференциях различного уровня:

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

и 22 международных: Второй международный форум по нанотехнологиям 6-8 октября, 2009 г., Москва, Россия; NSTI-Nanotech 2010 г., 21-24 июня, 2010г., Анаheim,

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

В работе использовался комплекс методов системного гигиенического, токсикологического анализа включая биохимические, цитохимические, функциональные, гистологические и морфометрические методы, оптическую, полуконтактную атомносиловую, сканирующую и просвечивающую электронную микроскопии, методы статистического анализа, математического моделирования и прогноза, использована методология анализа риска здоровью, методы биофилактики.

Поставленные в работе задачи решались в 18 сериях острых, субхронических и хронических экспериментов на более, чем 1000 аутбредных крысах-самках собственного разведения при начальной массе тела 150-220 г. в возрасте 3-4 месяцев. Для изучения токсических эффектов животные делились на группы не менее 10 особей в каждой.

Животные содержались в условиях специально организованного отделения вивария, соответствующего СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977г. № 755) и «International guiding principles for biomedical research involving animals», разработанными the Council for International Organizations of Medical Sciences (1985). Крысы принимали полнорационный комбикорм ООО «Лабораторкорм», который сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам и воду питьевую артезианскую «Ключи», доочищенную до первой категории качества.

Основные направления, объекты и объем исследований представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Перечень серий экспериментов

№ п/п	Серии экспериментов	Число крыс	Количество исследований
Оценка реакции альвеолярного фагоцитоза			
<i>при интратрахеальном введении:</i>			
1	частиц магнетита (Fe ₃ O ₄) трех размеров -10 нм, 50 нм и 1 мкм	52	208
2	медьсодержащих частиц 340 нм и 20 нм	39	468
3	наночастиц серебра, золота и микрочастиц серебра	82	574
4	наночастиц оксидов никеля двух размеров (11 нм и 25нм)	39	390
5	наночастиц оксидов никеля и железа	39	390
<i>при ингаляционной экспозиции:</i>			
6	к наночастицам оксида железа в течение 3, 6 и 10 месяцев	60	720
7	к наночастицам оксида никеля через 24 часа, 1 и 3 недели после окончания 5-кратного поступления	60	600
8	к наночастицам оксида никеля в течение 3, 6 и 10 месяцев	60	720
Сравнительная оценка токсического действия в субхронических экспериментах			
<i>при внутрибрюшинном введении:</i>			
9	частиц магнетита трех размеров -10 нм, 50 нм и 1 мкм	80	4000
10	наночастиц серебра и золота	60	3000
11	наночастиц оксидов никеля двух размеров (11 нм и 25 нм)	45	2250
12	медьсодержащих частиц 340 нм и 20 нм	24	120
<i>при ингаляционном поступлении:</i>			
13	оксида железа через 3, 6 и 10 месяцев	60	5700
14	оксида никеля после 5-кратной экспозиции	60	1800
15	оксида никеля через 3, 6 и 10 месяцев	60	5700
Оценка эффективности комплексов биопротекторов разнонаправленного действия, снижающих:			
16	токсическое и генотоксическое действие наночастиц серебра в субхроническом эксперименте	52	2800
17	генотоксическое действие наночастиц меди в субхроническом эксперименте	52	208
18	генотоксическое действие наночастиц никеля в 3 месячном ингаляционном эксперименте	40	80
19	цитотоксическое действие наночастиц никеля при интратрахеальном введении	40	200

Однократные интратрахеальные инсталляции и повторные внутрибрюшинные введения (3 раза в неделю в течение 6 недель) проводились с водными суспензиями частиц оксида железа Fe₃O₄ (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 (25 нм или 11 нм) в различных дозировках, соответствующих задачам экспериментов.

Наночастицы и микрочастицы магнетита были синтезированы химически, а остальные суспензии наночастиц получены лазерной абляцией пластин соответствующего металла 99,99% чистоты в деионизированной воде в Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВО «УрФУ им.первого Президента России Б.Н.

Ельцина». Характеристика распределения размеров НЧ давалась с помощью их прямого измерения сканирующей электронной микроскопией и метода динамического рассеяния света. Стабильность суспензий характеризовалась величиной дзета-потенциала, измеренного с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK).

Хронические ингаляционные экспозиции с НЧ Fe_2O_3 размером 14 ± 4 нм или NiO 23 ± 5 нм проводились по 4 часа в день, 5 раз в неделю в ингаляционной системе типа «только нос» CN Technologies, USA. Химическая идентичность НЧ, отобранных на поликарбонатные фильтры, устанавливалась с помощью Рамановской спектроскопии.

Реакцию альвеолярного фагоцитоза, а также внутриклеточную локализацию НЧ и вызываемых ими ультраструктурных повреждений изучали с помощью оптической, просвечивающей электронной (ПЭМ) и полуконтактной атомносиловой (пкАСМ) микроскопии клеток жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) через 24 ч. после интратрахеального введения суспензий изучаемых частиц или окончания ингаляционной экспозиции.

Токсические эффекты воздействия в субхронических внутрибрюшинных и хронических ингаляционных экспериментах оценивались после завершения экспозиционного периода по большому числу функциональных и биохимических показателей.

Определялись: масса тела (исходная и конечная), печени, почек, селезенки, головного мозга; «норковый рефлекс» и число пересеченных квадратов (Методические рекомендации, 1980); оценка способности ЦНС к суммации серии подпороговых импульсов (Методические рекомендации, 1980). Осуществлялся 24-часовой сбор мочи для определения ее объема, удельного веса и содержания копропорфирина, дельта-аминолевулиновой кислоты (δ -АЛК) (Павловская Н.А., 1998).

Затем крысы умерщвлялись перерезкой шейных сосудов, собиралась кровь, извлекались для взвешивания внутренние органы. С помощью автоматического гематологического анализатора МУТНІС-18 определялись гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, тромбоциты, лейкоциты, эритроциты. В мазках крови, окрашенных по Гимза-Романовскому, подсчитывалась лейкоцитарная формула крови, а при суправитальной (т.е. без предварительной фиксации) окраске бриллиант-крезиловым синим считали число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов. Проводилось цитохимическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови (Нарциссов Р.П., 1969). Определялось содержание восстановленного глутатиона, общего сывороточного белка, альбумина, глобулинов, суммарного билирубина, щелочной фосфатазы, аланин- и аспаргат-трансаминаз (АлАТ, АсАТ), каталазы, гамма-глутамилтрансферазы, креатинина,

мочевой кислоты и мочевины, свободных SH-групп, малонового диальдегида, церулоплазмينا в сыворотке крови, общего белка, креатинина, мочевины и мочевой кислоты. Все указанные анализы проводились при помощи биохимического анализатора «COBAS INTEGRA 400 plus» с использованием соответствующих диагностических наборов, кроме SH-группы в сыворотке крови (Ellman G., 1979), малонового диальдегида (Андреева Л.И., 1988) и церулоплазмينا (Бестужева С.В., 1976).

Описательная и морфометрическая оценка гистопатологических проявлений токсического повреждения внутренних органов (Гонохова М.Н., 2013; Кругликов Г.Г., 2014; Досынбаева Г.Н., 2016); оценка генотоксического эффекта (с помощью ПДАФ-теста) по коэффициенту фрагментации (Кфр) геномной ДНК в различных органах и в ядерных клетках крови (Wang S., 2017; Sharifiyazdi H., 2018; Ningombam S.S., 2018).

Как в интраперитонеальных, так и в ингаляционных экспериментах содержание вводимых в организм металлов в органах и в выделениях определяли с помощью атомной эмиссионной или адсорбционной спектроскопии (ААС), НЧ Fe₂O₃, NiO определяли еще и электронным парамагнитным резонансом (ЭПР-спектрометрии).

Для оценки эффективности биопротекторов против токсического действия наночастиц серебра, оксида меди и оксида никеля введены дополнительные группы животных, одна из которых подверглась аналогичному воздействию НЧ на фоне перорального получения биопрофилактического комплекса (БПК) либо предварительного приема БПК перед токсическим воздействием, вторая принимала БПК без воздействия НЧ (контроль на БПК).

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

Результаты исследований

В большом числе экспериментов обнаружено, что легочная фагоцитарная реакция на отложение металлических или металлооксидных НЧ является весьма выраженной. Увеличение клеточности БАЛЖ, как альвеолярных макрофагов (АМ), так и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), в ответ на отложение НЧ гораздо выше, чем на отложение микрочастиц (МЧ), при значительно более высокой нагрузке единичной фагоцитирующей клетки частицами, при равной дозе и той же химической идентичности (Таблица 2).

К тому же, этот сдвиг и, в особенности, увеличение числа нейтрофильных лейкоцитов с увеличением численного отношения НЛ/АМ тем более выражены, чем мельче частицы в пределах нанометрового диапазона. Например, судя по отношению НЛ/АМ, в случае

магнетита цитотоксичность частиц *in vivo* возрастает в порядке: 1000 нм < 50 нм < 10 (НЛ/АМ в контроле равно 0,15, при введении 1мкм – 1,32, при введении 50 нм – 4,42, при введении 10 нм – 6,23).

Мобилизация фагоцитоспособных клеток в глубокие дыхательные пути, проявляющаяся увеличением числа клеток в БАЛЖ, является типичной реакцией на отложение в них любых частиц, причем как общая клеточность, так и ее сдвиг в сторону полиморфоядерных, главным образом, нейтрофильных лейкоцитов тем более выражены, чем выше цитотоксичность этих частиц для альвеолярного макрофага. Поэтому отношение НЛ/АМ давно используется в качестве косвенного, но высоко информативного критерия сравнительной цитотоксичности пыли (Katsnelson B.A., Privalova L.I., 1984; Privalova L.I. et al. 1980; 1987; 1995).

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

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

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

Особо следует подчеркнуть, что, как это наблюдалось ранее, и при хронической ингаляционной экспозиции к полидисперсным пылям кварцита в концентрациях, измеряемых десятками мг/м³ (Privalova L.I. et al., 1987), хроническая ингаляция наноаэрозоля Fe₂O₃ со средней концентрацией 1,14 мг/м³ или NiO со средней концентрацией 0,23 мг/м³ вызвала аналогичные по знаку и сопоставимые по выраженности сдвиги клеточного состава БАЛЖ. В целом, принципиальная схожесть реакции на ингалируемые и интратрахеально введенные частицы (в данном случае, НЧ) подтверждает адекватность интратрахеальной модели (Таблица 3).

Полуконтактная атомно-силовая микроскопия выявила впервые описанные многочисленные «вдавления» 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 (Рисунки 1, 2).

Таблица 3 – Некоторые показатели бронхо-альвеолярного лаважа через 24 часа после завершающей ингаляции крыс наночастицами NiO в концентрации $0,23 \text{ мг/м}^3$, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показатели	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
Общее число клеток, $\times 10^6$	$3,50 \pm 0,66$	$21,40 \pm 6,01^*$	$2,94 \pm 0,53$	$8,38 \pm 0,81^*$	$3,44 \pm 0,46$	$9,63 \pm 1,15^*$
АМ, $\times 10^6$	$3,06 \pm 0,69$	$13,00 \pm 3,22^*$	$2,78 \pm 0,53$	$6,67 \pm 0,66^*$	$3,14 \pm 0,39$	$5,89 \pm 0,70^*$
НЛ, $\times 10^6$	$0,43 \pm 0,18$	$8,40 \pm 3,11^*$	$0,27 \pm 0,08$	$1,72 \pm 0,26^*$	$0,30 \pm 0,08$	$3,74 \pm 0,78^*$
Отношение НЛ/АМ	$0,26 \pm 0,18$	$0,61 \pm 0,11$	$0,11 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,04^*$	$0,09 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,12^*$

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

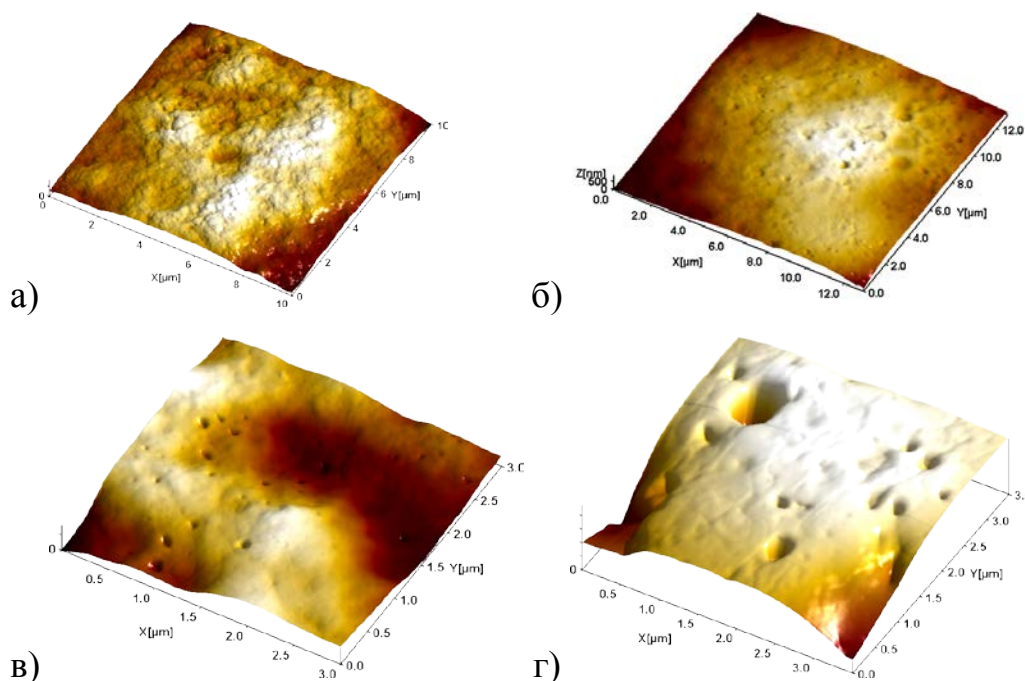


Рисунок 1 – Типичная топография поверхности клеток БАЛ при полуконтактной атомно-силовой микроскопии: (а), контрольная группа; (б) после введения магнетита 10 нм; (в) то же 50 нм; (г) то же 1 мкм.

Ряд косвенных, но в совокупности убедительных аргументов позволяет утверждать, что такое вдавление является не просто «пробоиной» от пассивного прохождения частицы через клеточную мембрану, а зафиксированным на определенный момент времени следом ее инвагинации в процессе активного эндоцитоза (фагоцитоза) частицы.

Средний диаметр «вдавнений» коррелирует со средним диаметром введенных НЧ, причем первый обычно заметно больше второго. Например, при действии НЧ золота 49 нм и серебра 50 нм средний диаметр вдавлений равен, соответственно, $75,2 \pm 0,3$ нм и $77,6 \pm 1,5$ нм.

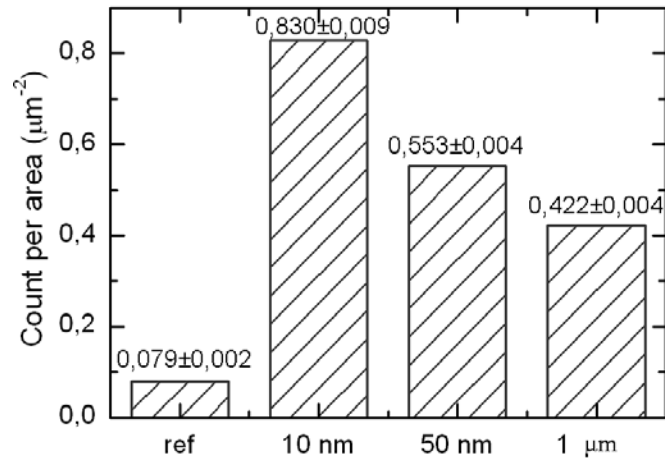


Рисунок 2 – Среднее ($\bar{x} \pm S_x$) число вдавлений на $1 \mu\text{m}^2$ поверхности альвеолярного макрофага после интратрахеального введения частиц магнетита разных размеров (ref – то же у контрольных крыс).

Важно подчеркнуть, что вышеописанный феномен образования «вдавнений» на поверхности альвеолярного макрофага не является артефактом, связанным с интратрахеальным введением относительно высоких доз наночастиц, поскольку он обнаруживается и при ингаляционной экспозиции к низкой концентрации НЧ Fe_2O_3 .

Сравнительная интенсивность фагоцитарной реакции легких на НЧ заданного диаметра и их биологическая агрессивность предопределяются и их химической природой.

Например, судя по цитологическим и/или биохимическим характеристикам БАЛЖ НЧ Ag существенно более цитотоксичны, чем НЧ Au, а НЧ NiO более цитотоксичны, чем НЧ Fe_2O_3 (Таблицы 4, 5).

Таблица 4 – Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,5 мг частиц Ag и Au в 1 мл воды, ($\bar{X} \pm S_x$)

Введенное вещество	Число клеток, $\times 10^6$			Отношение НЛ/АМ
	Общее число клеток	Нейтрофильные лейкоциты	Альвеолярные макрофаги	
Вода контроль)	1,41±0,33	0,13±0,04	0,89±0,18	0,14±0,023
НЧ Ag	4,25±0,77°	2,99±0,71*°	1,16±0,14	2,47±0,33*°
МЧ Ag	1,99±0,25	0,73±0,15*	1,24±0,19	0,66±0,13*
НЧ Au	2,30±0,93•	0,63±0,15*•	0,94±0,09	0,63±0,13*•

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; • – с группой «НЧ Ag»; ° – между группами «НЧ Ag» и «МЧ Ag» (при $p \leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 5 – Некоторые показатели бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после интратрахеального введения суспензии наночастиц NiO и Fe₂O₃ в дозе 0,2 мг/мл на одно животное, ($\bar{X} \pm S_x$)

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

Примечание: * – статистически значимое различие с контрольной группой; • – с группой «НЧ NiO» (при $p \leq 0,05$ по *t*-критерию Стьюдента).

При сравнительной оценке изменения топографии поверхности в экспериментах с НЧ Ag и НЧ Au наблюдался тот же феномен образования «вдавлений». Поскольку в этом случае сравниваемые НЧ были практически одного и того же среднего диаметра около 50 нм, то размеры «вдавлений» оказались не зависящими от химической природы металла. Однако средняя плотность инвагинаций («вдавлений») на единицу поверхности найдена равной 9,07 мкм⁻² для НЧ Au и 13,14 мкм⁻² для НЧ Ag, то есть в 1,45 раза выше для более цитотоксичного НЧ Ag, что отражает «жадность» поглощения частиц клеткой и этот показатель тем выше, чем выше их цитотоксичность.

От химической природы НЧ зависят и особенности их внутриклеточного распределения. Так, например, при просвечивающей электронной микроскопии АМ из БАЛЖ после введения НЧ серебра или НЧ золота оказалось, что первые имеют большее сродство к митохондриям, но меньшую способность к пенетрации внутрь ядра, чем вторые.

НЧ серебра и оксидов меди или никеля, даже будучи стабильными в деионизированной водной суспензии, ускоренно растворяются при добавлении к ней NaCl или модельной биологической среды (например, бесклеточной фракции БАЛЖ или стерильной сыворотки эмбриональной бычьей крови), причем одни и те же НЧ имеют неодинаковую растворимость в различных средах. Тот же эффект солубилизации в биосредах (особенно в сыворотке) НЧ наблюдался при изучении кинетики потери НЧ Fe₂O₃ или NiO с поверхности поликарбонатного фильтра, на котором они были задержаны при протягивании воздуха из ингаляционной установки (Рисунок 3).

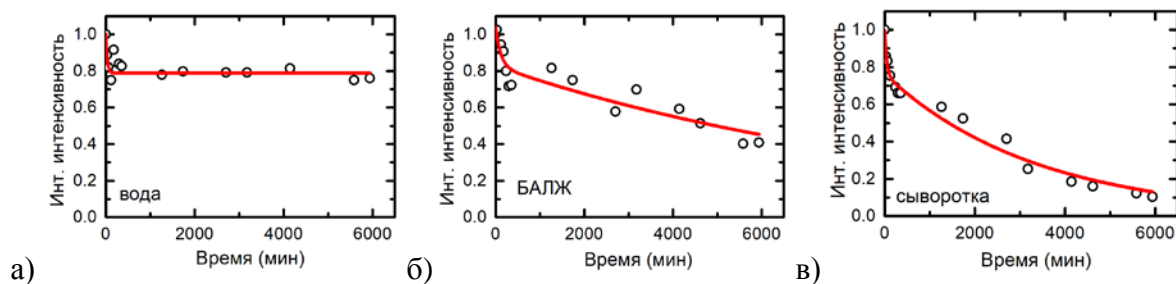


Рисунок 3 – Кинетика снижения интенсивности ЭПР-сигнала (в нормализованных произвольных единицах) от НЧ NiO: (а) в воде; (б) в супернатанте БАЛЖ; (в) в стерильной бычьей сыворотке крови.

Как физиологический, так и физико-химический механизмы самоочищения легких от НЧ, ослабляя токсическое повреждение ими этого органа, вместе с тем создают предпосылки к системной токсичности соответствующего металла, попадающего в различные органы либо в сохранившемся состоянии наноразмерной частицы, либо после ее растворения – в ионно-молекулярной, хелатной или белковосвязанной форме (которые рассматриваются суммарно, условно обозначая их как «ионы»).

Вопрос о том, какой из токсикокинетических процессов наиболее важен, имеет существенное значение, но изучен он недостаточно полно. Ранее серией экспериментальных исследований и связанным с ними многокамерным математическим моделированием (Katsnelson V.A., Privalova L.I., 1984; Привалова Л.И., 1990; Katsnelson V.A. et al., 1992; 1994; 1997) было обосновано представление о том, что судьба практически нерастворимых МЧ, отложившихся в глубоких дыхательных путях при хронической ингаляционной экспозиции, контролируется физиологическими механизмами макрофагального и нейтрофильного фагоцитоза, а также мукоцилиарного транспорта и поэтому зависит от размера и цитотоксичности частиц. Показано, что их длительная задержка в легких и трахеобронхиальных лимфоузлах может быть удовлетворительно предсказана при математическом моделировании этих механизмов даже без учета различий растворимости таких МЧ.

Используя набор параметров этой модели (констант скорости переноса) для построения модели кинетики легочной задержки, перераспределения и клиренса НЧ Fe_2O_3 , а в дальнейшем и НЧ NiO, направление и пределы изменения этих параметров задавались как теоретическими и априорными соображениями, так и результатами сравнительной оценки клеточной популяции БАЛЖ. Однако оказалось невозможным даже отдаленно имитировать фактические данные о задержке НЧ Fe_2O_3 и NiO в легких и лимфоузлах, которые были намного ниже прогнозируемых моделью.

Удовлетворительно приблизиться к ним удалось только введя в модель потоки элиминации, связанные с растворением и отчасти с прямой пенетрацией наночастиц в кровь и лимфу (Рисунок 4).

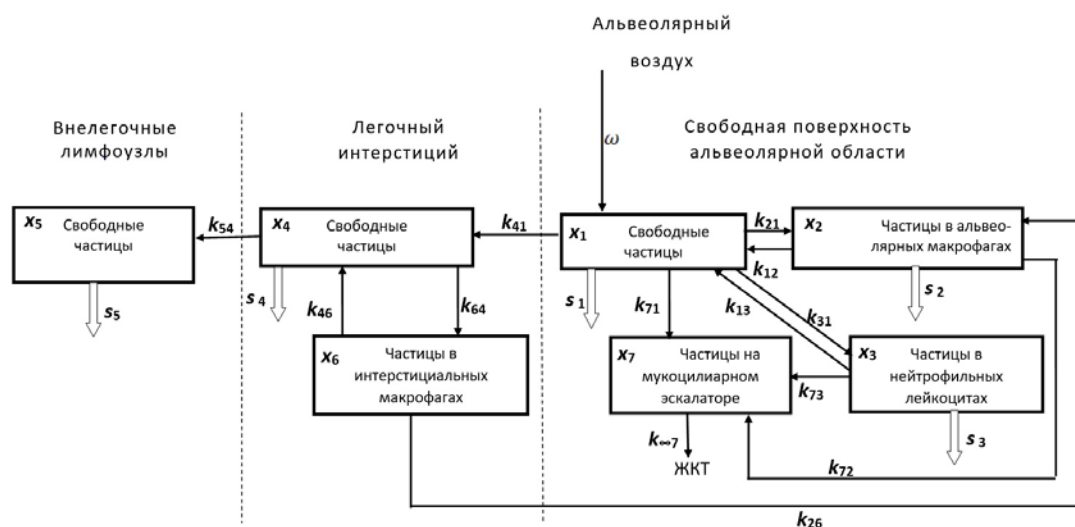


Рисунок 4 – Структура многокамерной модели кинетики легочной задержки, перераспределения и клиренса наночастиц, отложившихся при дыхании в пульмонарной области легких, с учетом их растворимости (добавлены потоки S).

При выборе значений соответствующих констант скорости растворения наночастиц *in vivo* ориентировались на значения, полученные при их растворении *in vitro*, и только в том случае, когда в модель были включены близкие к реальным константы скорости растворения наночастиц, она прогнозировала характерную для токсикокинетики 1-го порядка кривую накопления вещества в органе с постепенным выходом на плато. При этом ни одна из них не отклоняется от кривой статистически значимо (Рисунок 5).

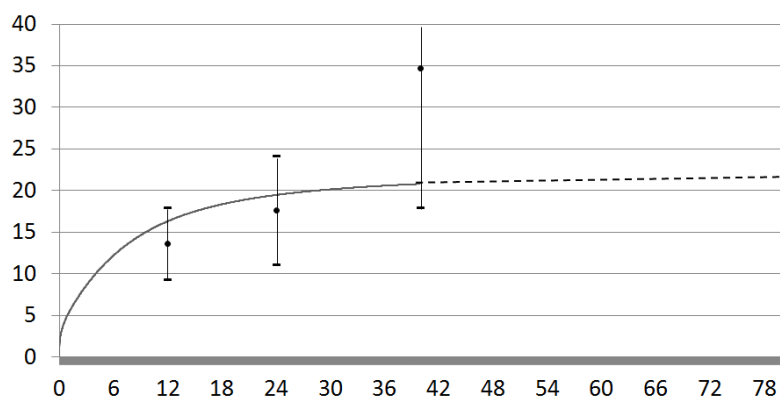


Рисунок 5 – Временной ход накопления НЧ Fe_2O_3 в легких крыс, предсказываемый модифицированной многокамерной моделью на 10-месячный период реально осуществленных ингаляционных экспозиций (сплошная линия) и в случае его удлинения до 20 мес. (пунктирная линия). По оси абсцисс отложены недели от момента начала экспозиций, по оси ординат – абсолютное содержание Fe_2O_3 в легких, $\mu\text{г}$. Экспериментальные показатели обозначены с 95% ДИ.

Таким образом, эксперимент дал вполне удовлетворительное подтверждение consistency модели.

Нет оснований отрицать возможность и пассивной пенетрации (диффузии) наночастиц через клеточную мембрану любой клетки.

При электронной микроскопии обнаружено накопление НЧ в альвеолоцитах типа I и типа II (Рисунок 6), которое с рассматриваемых позиций легочной токсикокинетики частиц является промежуточной фазой их транслокации через альвеолярную мембрану, чему в модели соответствует переход из камеры X_1 в камеру X_4 .

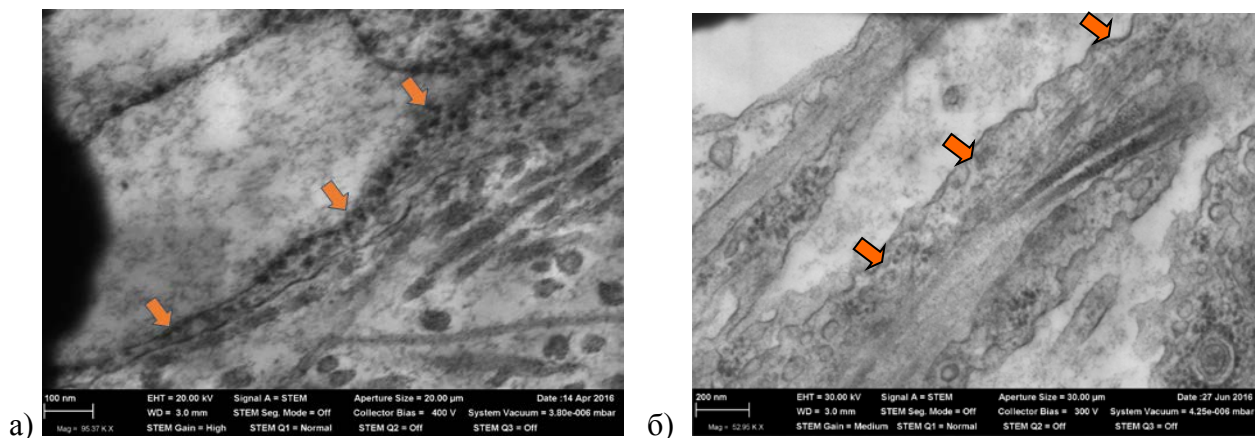


Рисунок 6 – Альвеолоциты типа I (указаны стрелками) в легких крыс (а) после 6 мес. экспозиции, увеличение $\times 95\,370$ и (б) соответствующей контрольной группы, увеличение $\times 52\,950$. Наночастицы различимы только в случае (а). ПЭМ.

Этой моделью данный процесс рассматривается как пассивная диффузия, но нельзя исключить какую-то роль физиологического (клеточно-опосредованного) компонента. С другой стороны, участвующие в нем клетки, образующие альвеолярную мембрану, могут быть повреждены действием цитотоксичных частиц. В альвеолоците типа II зафиксирована выраженная дезорганизация мембран мультиламеллярного тельца и можно предположить, что такое повреждение этих органелл, участвующих в образовании сурфактанта, может привести к нарушениям легочной механики (а тем самым – и внутрилегочного перемещения наночастиц).

Таким образом, наиболее существенная адаптация исходной модели к условиям воздействия наночастиц связана с необходимостью математического описания как физиологических механизмов их элиминации из легких и внутрилегочной транслокации, так и кинетики растворения *in vivo* при том, что относительный вклад последнего может быть различным для наночастиц разной химической природы.

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-

микрометровых МЧ (Таблица 6), однако *внутри* нанометрового диапазона зависимость некоторых токсических эффектов от диаметра частиц была обратной, что особенно характерно для органов, богатых клетками ретикулоэндотелиальной системы.

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 (Таблица 6).

Таблица 6 – Некоторые показатели состояния организма крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц магнетита разного размера в дозе 500 мг/кг, ($\bar{X}_{cp} \pm S_x$)

Показатель	Вода (контроль)	Введенное вещество		
		10 нм	50 нм	1 мкм
Гемоглобин в крови, г/л	130,13±2,94	140,70±4,13 [■]	134,1±3,7	126,74±3,29
Эритроциты, $\times 10^{12}$ г/л	5,37±0,12	5,76±0,14*	5,52±0,12	5,45±0,12
Ретикулоциты, ‰	11,3±0,7	53,62±1,91* [■]	36,73±1,21*	14,72±1,24* [•]
Железо в сыворотке крови, мг/л	77,15±7,24	168,14±26,41* [•]	262,8±23,9*	91,98±13,38 [•]
МДА в сыворотке крови, нмоль/л	4,39±0,11	6,01±0,36* [■]	6,3±0,3*	4,42±0,11 [•]
δ -АЛК в моче, мкМ/24 ч	0,34±0,04	0,42±0,07	0,58±0,06* [■]	0,39±0,04
Креатинин в моче, мкмоль/24 ч	4,07±0,91	6,78±1,42	11,25±2,16* [■]	4,24±0,57
Безъядерные гепатоциты, на 100 клеток печени	13,1 ± 0,9	37,0 ± 1,6* [■]	44,4 ± 1,3* [■]	19,6 ± 1,7*
Двухъядерные гепатоциты, на 100 клеток печени	5,1 ± 0,5	2,3 ± 0,3* [■]	2,0 ± 0,3* [■]	6,1 ± 0,6
Клетки Купфера, на 100 клеток печени	27,2 ± 1,6	31,8 ± 2,0 [•]	19,2 ± 3,3 [■]	33,2 ± 0,4*

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

Та же неоднозначная зависимость токсичности от размера наблюдалась и в сравнительном эксперименте с НЧ NiO 11 нм и 25 нм (Таблица 7).

Таблица 7 – Некоторые морфометрические показатели печени и селезенки крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц оксида никеля разного размера в дозе 4,0 мг/кг, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показатели	Введенное вещество		
	Вода (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм
Печень, количество на 100 клеток печени			
Безъядерные гепатоциты	23,43±0,85	41,29±1,54*	48,73±1,35* [•]
Двухъядерные гепатоциты	4,47±0,49	4,52±0,52	2,23±0,31* [•]
Селезенка			
Отношение красной пульпы к белой	7,71±1,62	4,27±0,067	3,50±0,49*
Диаметр фолликула, мкм	11,94±0,35	9,71±0,30*	10,21±0,24*

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

Кроме того, как видно из Рисунка 7 и Таблицы 8 наблюдается разница и в накоплении частиц в органах, определяемом методом ААС. Так, если в печени содержание НЧ не зависит от их размера и практически одинаково, то в селезенке крупных наночастиц статистически значимо накапливается больше. Такая закономерность найдена в обоих экспериментах. Это можно объяснить тем, что наночастицы проникают из первичного депо в кровь, а через нее в печень и далее в органы, находясь на всем пути в процессе растворения. Причем этот процесс сравнительно более интенсивен для наночастиц меньшего диаметра в силу их наиболее развитой суммарной поверхности, что может снизить итоговую задержку вещества в ткани данного органа. Поэтому к моменту поступления наночастиц в селезенку, мелкие наночастицы растворились в большей степени.

Частицы же магнетита диаметром 1 мкм в печени и селезенке практически не обнаруживаются (Рисунок 5), что связано как с их малой способностью к диффузионной пенетрации через серозную оболочку брюшной полости в кровь из первичного депо на месте введения, так и наименьшей растворимостью микрометровых частиц.

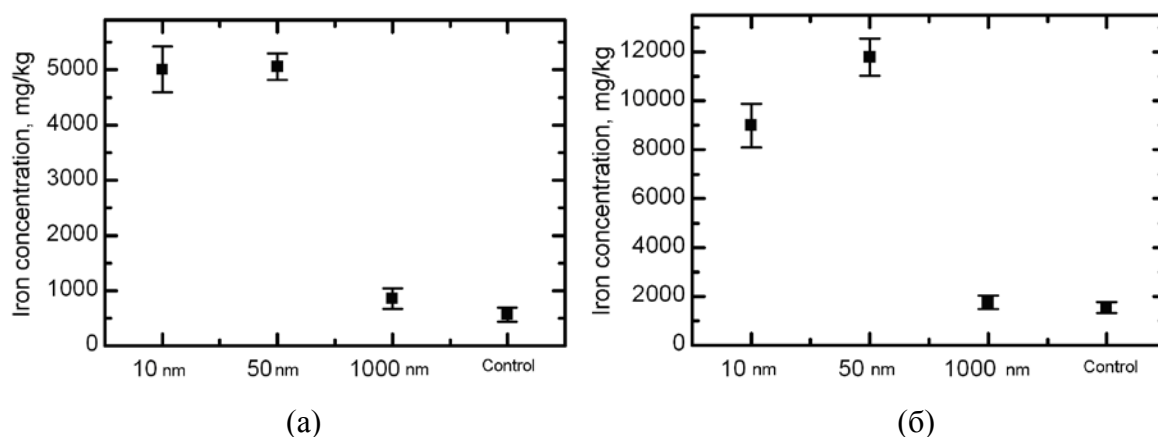


Рисунок 7 – Среднее значение суммарной концентрации железа в тканях (а) печени и (б) селезенки крыс, получавших магнетит с частицами разного размера. Метод ААС.

Таблица 8 – Содержание никеля в лиофилизированной ткани крыс после повторных внутрибрюшинных введений частиц оксида никеля разного размера в дозе 4,0 мг/кг, оцененное атомно-эмиссионной спектроскопией, мкг/г, ($\bar{X} \pm S_x$)

Органы	Введенное вещество		
	Вода (контроль)	НЧ NiO 11 нм	НЧ NiO 25 нм
Печень	1,25±0,42	51,28±5,3*	50,15±3,29*
Селезенка	4,6±1,0	24,4±2,4*	40,1 ±5,9*•

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

При равном же размере НЧ накопление металлов в органах контролируется сравнительной растворимостью и сравнительной цитотоксичностью, определяемыми химической природой металла. Так, при субхронической затравке равноразмерными НЧ Ag и Au, более растворимые и более цитотоксичные НЧ Ag накапливались и в печени ($0,12 \pm 0,01$ мг на г сухой массы), и в селезенке ($0,40 \pm 0,04$ мг) в меньшем количестве, чем наночастицы золота (соответственно, $0,20 \pm 0,02$ мг и $0,50 \pm 0,1$ мг; по печени разница значима при $p < 0,01$). Напротив, те же самые различия растворимости естественно приводят к большему накоплению серебра, чем золота в почках, через которые выводятся не столько сами НЧ, сколько перешедшие из них в кровь ионы металла: соответственно, $0,26 \pm 0,09$ мг и $0,010 \pm 0,001$ мг на г сухой массы ($p < 0,05$).

Кроме того, обнаруживается, что очень мелкие наночастицы (например, Fe_2O_3 или NiO), даже если они определенно являются цитотоксичными, как было показано выше (Таблица 5) могут обладать низкой хронической ингаляционной токсичностью из-за их высокой растворимости в биологических средах и, следовательно, низкой персистенцией как в легких, так и транслокацией в органы. Однако, кроме легких, как НЧ NiO, так и НЧ Fe_2O_3 обнаруживаются при просвечивающей электронной микроскопии в ольфакторной области головного мозга, где они найдены только в миелиновой оболочке внутримозговых нервных волокон и сопряжены с очаговой демиелинизацией (Рисунок 8).

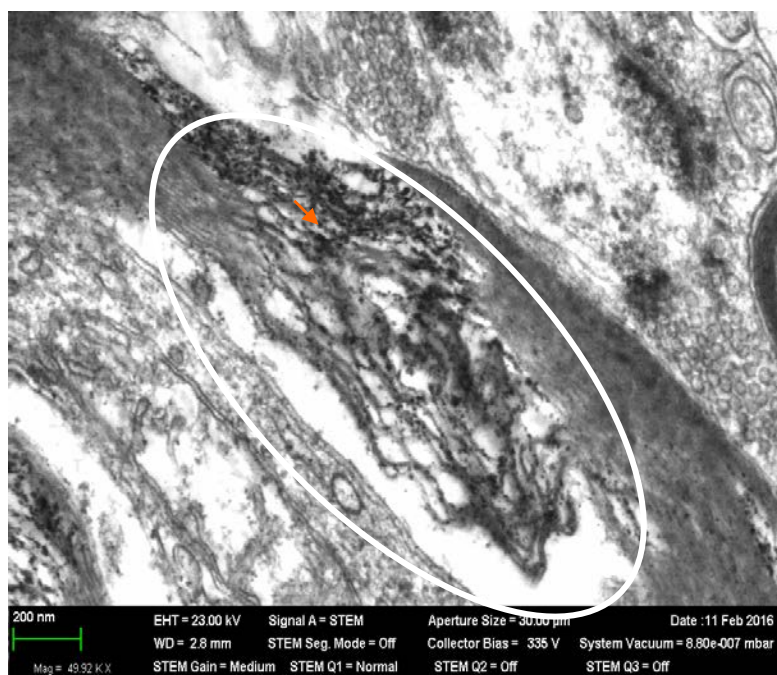


Рисунок 8 – Продольное сечение нервного волокна в ольфакторной зоне головного мозга крысы после 10 месячной ингаляционной экспозиции. Очаговое повреждение миелиновой оболочки связано с накоплением наночастиц (отмечено стрелкой). ПЭМ, увеличение $\times 49\,920$.

Такая локализация может быть объяснена транслокацией НЧ со стороны ольфакторного эпителия носовой полости, в которой они отлагаются в значительной степени напрямую в мозг вдоль волокон обонятельного нерва. При этом общего накопления Fe_2O_3 и NiO в мозгу крыс оказалось недостаточным для количественного определения с помощью ЭПР-спектроскопии.

Если соединения того или иного металла обладают каким-либо специфическим токсическим эффектом, то этот эффект может оказаться характерным и для токсичности НЧ, содержащих этот металл. Так, например, как было представлено в Таблице 6, НЧ магнетита вызывали в субхроническом эксперименте при внутрибрюшинном введении реакцию со стороны красной крови, которая может быть связана со *специфической* ролью железа в кроветворении. Найденный повышенный уровень МДА в сыворотке крови, может быть также связан с известным влиянием железа на свободно-радикальные процессы.

Таблица 9 – Показатели состояния организма крыс, подвергавшихся ингаляционной заправке наночастицами NiO в концентрации $0,23 \text{ мг/м}^3$, через 24 часа после окончания экспозиции, ($\bar{X} \pm S_x$)

Показатели	Время экспозиции					
	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{мл}$	$6,37 \pm 0,22$	$7,08 \pm 0,17 *$	$7,23 \pm 0,11$	$6,94 \pm 0,12$	$6,92 \pm 0,24$	$6,75 \pm 0,08$
Гемоглобин, г/л	$141,3 \pm 3,5$	$158,2 \pm 2,8 *$	$152,8 \pm 1,8$	$151,1 \pm 2,1$	$151,5 \pm 3,8$	$154,7 \pm 2,2$
Гематокрит, %	$37,18 \pm ,16$	$41,56 \pm 0,86 *$	$43,28 \pm 0,58$	$43,18 \pm 0,66$	$39,94 \pm 1,22$	$39,22 \pm 0,84$
Содержание ретикулоцитов в периферической крови, ‰	$11,92 \pm 1,28$	$16,75 \pm 1,39 *$	$13,73 \pm 1,28$	$20,39 \pm 1,56 *$	$12,55 \pm 0,86$	$15,89 \pm 0,62 *$

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

Как видно из Таблицы 9 были отмечены относительно специфичные для токсических эффектов никеля изменения показателей клеток красной крови при хронической ингаляционной экспозиции к НЧ NiO, свидетельствующие о фазовой стимуляции эритропоэза.

Проявление реакции гиперергического типа (увеличение доли эозинофилов в отпечатках органов и активация реакции специфического лизиса лейкоцитов после ингаляции НЧ NiO ($15,84 \pm 2,28$) по сравнению с контролем ($7,56 \pm 0,74$), также может быть связано со свойством никеля как аллергена.

Химическая природа наночастиц также определяет различия не только их цитотоксичности и системной токсичности, но и полиорганной генотоксичности. Например, как видно из Таблицы 10, НЧ Au и НЧ Ag обладают генотоксичностью, но при этом генотоксичность НЧ Ag заметно выше (при статистической значимости этого различия для печени и селезенки), что свидетельствует о зависимости выраженности и этого действия от химической природы частиц.

Таблица 10 – Коэффициенты фрагментации геномной ДНК крыс после повторных внутрибрюшинных введений наночастиц серебра или золота в дозе 10 мг/кг, ($\bar{X}_{cp} \pm S_x$)

Ткани	Введенное вещество		
	Вода (контроль)	НЧ Au	НЧ Ag
Печень	0,399±0,001	0,392±0,010 ^o	0,461±0,002*
Костный мозг	0,3±0,003	0,412±0,014*	0,455±0,032*
Селезенка	0,379±0,002	0,397±0,008 ^o	0,462±0,001*
Почки	0,385±0,003	0,422±0,009*	0,42±0,008*
Ядродержащие клетки периферической крови	0,383±0,001	0,403±0,018	0,413±0,012*

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль»; ^o – с группой «НЧ Ag» (при $p \leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Различия между НЧ и МЧ при повторных внутрибрюшинных введениях медьсодержащих частиц 20 нм и 340 нм по влиянию на коэффициент фрагментации ДНК оказались невелики и неоднозначны: если в селезенке оно более выражено при действии НЧ, то в печени примерно одинаково (Таблица 11).

Таблица 11 – Коэффициенты фрагментации геномной ДНК крыс после повторных внутрибрюшинных введений медьсодержащих частиц разного размера в дозе 10 мг/кг, ($\bar{X}_{cp} \pm S_x$)

Органы	Введенное вещество		
	Вода (контроль)	НЧ 20 нм	МЧ 340 нм
Печень	0,396±0,0020	0,426±0,0020*	0,421±0,0030*
Селезенка	0,369±0,0016	0,460±0,0020* ^o	0,391±0,0023*

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

При ингаляционной экспозиции НЧ NiO во все три срока хронического эксперимента найдено выраженное усиление коэффициента фрагментации геномной ДНК, оцененное в ядродержащих клетках крови, причем происходит значимое нарастание этого эффекта с увеличением времени воздействия (через 3 месяца ингаляции НЧ NiO Кфр равен

0,448±0,0017, через 6 мес. – 0,533±0,0031, через 10 мес. – 0,4244±0,5447, значения Кфр крыс контрольной группы 0,4229±0,0008, 0,4247±0,0006 и 0,4244±0,0005 соответственно, при статистически значимом различии $p \leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

В эксперименте при хронической ингаляционной экспозиции к НЧ Fe₂O₃ при отсутствии общетоксических эффектов, наблюдалось статистически значимое во все сроки эксперимента повышение Кфр, оцененного в клетках печени и костного мозга (Таблица 12).

Этот результат особо важен в связи с тем, что электродуговая сварка, в том числе так называемых мягких (т.е. нелегированных) сталей признана на основании большого числа онкоэпидемиологических данных производственным процессом, вызывающим развитие рака у человека (Приложение к СанПиН 1.2.2353-08). Между тем, в составе сварочного аэрозоля преобладает субмикронная, в т.ч. нанометровая фракция Fe₂O₃ – вещества, не обладающего канцерогенностью в микрометровом диапазоне. Показанная генотоксичность НЧ Fe₂O₃ при ингаляционном воздействии даже в относительно невысокой концентрации может рассматриваться как объяснение канцерогенности сварочного аэрозоля даже при отсутствии в его составе таких облигатных канцерогенов, как хром, никель и др.

Таблица 12 – Коэффициент фрагментации геномной ДНК в печеночных и костномозговых клетках крыс, подвергавшихся хронической ингаляционной заправке наночастицами Fe₂O₃ в концентрации 1,14 мг/м³, ($\bar{X} \pm S_x$)

Время ингаляционной экспозиции					
3 мес		6 мес		10 мес	
Контроль	НЧ Fe ₂ O ₃	Контроль	НЧ Fe ₂ O ₃	Контроль	НЧ Fe ₂ O ₃
Печень					
0,417969± 0,0002718	0,422847± 0,0005175*	0,4175± 0,000369	0,4235± 0,0003474*	0,417417± 0,000342	0,424502± 0,000566*
Костный мозг					
0,399± 0,000532	0,403895± 0,0005175*	0,399583± 0,000507	0,4047± 0,000555*	0,398167 ±0,000572	0,404269± 0,00053*

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

По-видимому, для определенных наноматериалов не столько системная токсичность, сколько генотоксичность (и тем самым – вероятная канцерогенность) должна рассматриваться как лимитирующий фактор вредности.

Для любых потенциально вредных веществ установление выполнимых стандартов допустимой экспозиции, как бы они ни назывались и каков бы ни был их юридический статус в той или иной стране, опирается на одну и ту же, признаваемую открыто или

принимаемую по умолчанию принципиальную предпосылку: созданные эволюцией защитные и компенсаторные механизмы дают возможность человеческому организму адаптироваться к неким низким уровням той или иной вредной экспозиции без заметного нарушения здоровья и даже без уловимого повышения риска вредных стохастических эффектов над фоновым уровнем. Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что организм подобным же образом не беззащитен и по отношению к металлсодержащим НЧ.

С другой стороны, полученные данные подтверждают преобладающие представления, согласно которым вещество, даже относительно безвредное и мало опасное в обычном состоянии (подобно магнетиту), может оказаться выражено токсичным в наноразмерном диапазоне, 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 органно-системном может по некоторым эффектам снижаться, оставаясь все же более высокой по сравнению с даже мельчайшими частицами микрометрового диапазона.

Необходимость установления предположительно безопасных концентраций НЧ признается несомненной, и в некоторых странах такие величины начали приниматься в качестве обязательных или хотя бы рекомендательных нормативов.

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

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

предосторожности» (the precautionary principle), что при современном развитии нанотоксикологии должно быть признано вполне оправданным.

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

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

Такова, например, пересмотренная американским National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) величина REL (Recommended Exposure Level) для любых НЧ диоксида титана, равная $0,3 \text{ мг/м}^3$, что в 8 раз ниже, чем для «тонких» (т.е. микрометровых) частиц того же вещества ($2,4 \text{ мг/м}^3$). Между тем, разнообразные нанопорошки диоксида титана производятся промышленностью и поступают на мировой рынок для различного использования при существенно различающихся размерах первичных НЧ (например, одним из поставщиков - приблизительно 10 нм, 10-30 нм, ≤ 50 нм).

Сходный и даже более жесткий подход к установлению групповых стандартов безопасности для искусственных наноматериалов был принят в 2010 году Австралийским правительственным агентством «Safe Work Australia». В частности, для любых нанокристаллов, квантовых точек, НЧ керамических оксидов и НЧ металлов ориентировочный норматив, называемый BEL (Benchmark Exposure Level) должен быть равен $0,066\text{WEL}$ (где WEL означает Workplace Exposure Limit, то есть «предел экспозиции на рабочем месте» к тому же веществу в обычном состоянии) – другими словами, речь идет о снижении норматива в 15 раз.

В российских ГН 1.2.2633-10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды», имеется рубрика «Диапазон размеров частиц, нм (10-90 перцентиль)» и, в частности, для норматива ОБУВ диоксида титана в воздухе рабочей зоны указан диапазон 5-50 нм. В технологических характеристиках наноматериалов подобных данных о перцентильном распределении частиц по размерам, как правило, нет. В том же документе указанный диапазон 5-50 нм дан и для наночастиц серебра (нормируемых только по ОДУ в воде).

Из всего этого следует, что: (а) *в принципе* установление нормативов типа ПДК или ОБУВ для содержания НЧ в воздухе рабочих помещений не менее оправдано, чем для содержания МЧ; (б) такие нормативы должны быть *существенно ниже* установленных для МЧ той же химической природы; (в) на данном этапе НЧ могут нормироваться без подразделения по суб-фракциям нанодиапазона.

Исходя из того, что реагирование защитно-компенсаторных механизмов организма на наночастицы имеет те же закономерности как и на микрочастицы, то при ускоренном нормировании наночастиц можно использовать тот же подход сложившийся на основании длительного опыта отечественной профилактической токсикологии общей теории и практики экспериментально-токсикологического обоснования гигиенических нормативов содержания вредных веществ в воздухе рабочих помещений, а именно выбора величины норматива путем сопоставления с теми, которые уже регламентированы для вредных веществ, близких к вновь исследуемому по составу и/или характеру действия на организм, осуществляемый с учетом того, насколько близки или количественно неодинаковы сдвиги диагностических показателей состояния организма при действии одного-двух ранее регламентированных и вновь исследуемого вещества.

Согласно «Методическим указаниям по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны» № 4000-85 эти уровни (ОБУВ) могут устанавливаться как расчетом на основе параметров токсикометрии, так и путем интерполяций и экстраполяций в рядах соединений, близких по химической структуре, физическим и химическим свойствам и характеру биологического действия». При этом подчеркивается, что «выбор способа установления ОБУВ производится в зависимости от степени изученности вещества и принадлежности к химической группе».

Именно этот подход, основанный на экстраполяции и интерполяции в рядах с имеющим норматив микрометровым аналогом по химической природе, является реальным применительно к нормированию наночастиц.

Таким образом, величины ОБУВ для тех НЧ, химические аналоги которых, загрязняющие воздух рабочей зоны в виде микроразмерных частиц (МЧ), имеют ранее установленные гигиенические нормативы (ПДК или ОБУВ), могут устанавливаться исходя из результатов сравнительной токсикологической оценки соответствующих НЧ и МЧ в кратковременных экспериментах на лабораторных животных (преимущественно на белых крысах).

В случае выявления существенно более высокой биологической агрессивности НЧ, для них эти гигиенические нормативы снижаются в большей или меньшей степени. Конкретное значение понижающего коэффициента (в пределах 10-20 крат) выбирается

экспертно в зависимости от того, по какому числу эффектов действия частиц и насколько велика выявленная разница, и с учетом биологической важности соответствующих эффектов.

Для тех НЧ, которые не имеют химических аналогов микрометрового диапазона с ранее установленными гигиеническими нормативами, в принципе тот же сравнительный токсикологический подход может быть реализован с использованием МЧ, относительно близких к таким НЧ по химическому составу. Например, для НЧ магнетита (Fe_3O_4), который не имеет ПДК или ОБУВ в форме МЧ, образцом сравнения могут служить МЧ другого оксида железа (Fe_2O_3), имеющего установленную ПДК. Кроме того, по мере увеличения числа НЧ с уже установленными ПДК или ОБУВ, из этого числа также могут выбираться образцы сравнения для нормирования новых НЧ.

В качестве одного из таких ускоренных методов для сравнительной оценки токсического действия НЧ *in vivo* можно использовать изменение количественной характеристики реакции глубоких дыхательных путей на отложение частиц по цитологическим и биохимическим показателям жидкости, получаемой при бронхоальвеолярном лаваже, в связи с тем, что НЧ которые более цитотоксичны для альвеолярных макрофагов, предположительно более цитотоксичны и для любых других клеток, внутрь которых они попадают.

Исходя из изложенных выше подходов и на основе экспериментальных данных была предложена для рассмотрения в качестве ориентировочно безопасного для НЧ в воздухе рабочих помещений концентрация для оксидов железа $0,4 \text{ мг/м}^3$.

Подтверждением запаса надежности этой величины может служить полученные экспериментальные результаты ингаляционного эксперимента с НЧ Fe_2O_3 которые в совокупности с методическими соображениями позволяют расценить среднюю за полный период экспозиции (10 мес.) концентрацию $1,14 \text{ мг/м}^3$ (которая в 2,5 раза выше предложенной на основании сравнительного подхода величины ОБУВ для наночастиц Fe_3O_4) как пороговую при хроническом ингаляционном воздействии (Lim_{ch}) в том значении этого термина, который принят в отечественной профилактической токсикологии.

В соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» так называемый коэффициент запаса, служащий для перехода от пороговой к предельно допустимой концентрации, обычно устанавливается в пределах от 3 до 20. Следует учесть, что по абсолютному большинству эффектов испытанная концентрация является фактически не действующей. Кроме того, 2,5-кратное удлинение экспериментального периода по сравнению с предусмотренным этими МУ само по себе вносит значительный запас

надежности в оценку величины Lim_{ch} . По этим двум соображениям, можно считать возможным принять величину коэффициента запаса $\approx 2,9$, близкую к указанной минимальной, и тем самым, предложить норматив среднесменной ПДК в воздухе рабочей зоны как для дижелеза триоксида (Fe_2O_3) в форме наночастиц на уровне $0,4 \text{ мг/м}^3$.

Эта величина в 15 раз ниже среднесменной ПДК 6 мг/м^3 , установленной в ГН 2.2.5.1313-03 для того же вещества в обычной форме, и можно отметить, что снижение действующих нормативов на один-полтора порядка при установлении допустимых уровней экспозиции для металлических и металлооксидных наночастиц соответствует международной практике. Это предложение было принято Роспотребнадзором, и затем в ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 13.02.2018 была внесена следующая формулировка среднесменная концентрация «железо(III)оксид наночастицы $0,4 \text{ мг/м}^3$ ».

Какие бы низкие уровни НЧ-экспозиции ни были установлены как допустимые, особая потенциальная опасность этого класса загрязнителей воздуха обуславливает высокую целесообразность поиска возможности сделать организм менее чувствительным к их вредному действию с помощью комплекса неспецифических и специфических биопротекторов, которые в профилактически эффективных дозах не имели бы собственных побочных эффектов. Общая концепция такой «биологической профилактики», теоретические предпосылки и многочисленные примеры ее реализации были неоднократно опубликованы (Кацнельсон Б.А. и соавт., 1995; Кацнельсон Б.А. с соавт., 2005; Привалова Л.И. с соавт. 2008; 2009).

Против вредного действия металлических наночастиц были теоретически разработаны и экспериментально апробированы комплексы биопротекторов повышающих резистентность организма к вредному действию наночастиц серебра, оксида меди и оксида никеля.

Так, при предварительном приеме БПК в течении месяца перед интратрахеальным введением НЧ NiO ослабляется их цитотоксическое действие (если при введении НЧ NiO уровень лактатдегидрогеназы в надосадочной жидкости бронхоальвеолярного лаважа равен $190,9 \pm 38,0 \text{ Е/л}$, то на фоне действия БПК происходит его статистически значимое снижение – $81,1 \pm 24,4 \text{ Е/л}$, при уровне у контрольных крыс $21,0 \pm 4,7 \text{ Е/л}$).

В Таблице 13 приведены некоторые показатели, отражающие снижение гепато- и спленотоксического действия НЧ Ag.

Таблица 13 – Некоторые морфометрические показатели клеточной структуры печени и селезенки крыс, ($\bar{X}_{cp} \pm S_x$)

Показатели	Группы крыс, получавшие		
	Воду (контроль)	НЧ Ag	НЧ Ag + БПК
Число клеток Купфера	16,5±0,5	25,0±0,8*	20,0±0,6*•
Средневзвешенный балл нагруженности клеток Купфера частицами ¹	0	0,91±0,7	0,51±0,09•
Отношение белой к красной пульпе селезенки ²	0,59±0,036	0,37±0,035*	0,59±0,086•

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

Из данных Таблиц 14 и 15 видно, что вызываемая субхронической интоксикацией крыс наночастицами оксида меди или серебра фрагментация ДНК клеток печени, селезенки, костного мозга (при действии НЧ серебра – и почек) значимо ослабляется на фоне приема БПК, что свидетельствует о его противогенотоксическом эффекте.

Таблица 14 – Влияние БПК и/или наночастиц серебра на коэффициент фрагментации геномной ДНК (ПДАФ-тест) в клетках различных органов, ($\bar{X} \pm S_x$)

Группы крыс, получавшие:	Ткани			
	Печень	Костный мозг	Селезенка	Почки
Воду (контроль)	0,399±0,001	0,385±0,003	0,379±0,002	0,385±0,003
НЧ Ag	0,461±0,002 *	0,455±0,032 *	0,462±0,001*	0,423±0,008 *
НЧ Ag + БПК	0,408±0,011°	0,373±0,003 *°	0,419±0,003 *°	0,407±0,006 *°

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

Таблица 15 – Влияние БПК и/или медьсодержащих наночастиц на коэффициент фрагментации геномной ДНК (ПДАФ-тест) в клетках различных органов, ($\bar{X} \pm S_x$)

Органы	Группы крыс, получавшие			
	НЧ 20 нм	НЧ 20 нм +БПК	Воду + БПК	Воду (контроль)
Печень	0,426± 0,0020*	0,404± 0,002*•■	0,394± 0,0040	0,396± 0,0020
Селезенка	0,460± 0,0020*	0,418± 0,0015*•■	0,377± 0,0028*	0,369± 0,0016
Костный мозг	0,355± 0,0020	0,335± 0,0021*•■	0,356± 0,0025	0,354± 0,0028

Примечание: * – статистически значимое различие с группой «контроль», ■ – с группой «НЧ 20 нм», □ – с группой «Воду + БПК» (при $p \leq 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

¹ Визуальная оценка нагруженности клетки частицами выражается в баллах от 0 до 4. Средне-взвешенный показатель рассчитывается с учетом процентного соотношения между клетками, оцененными разными баллами (общее число оцененных клеток - 100).

² Результаты планиметрии с помощью сетки Автандилова

Таким образом, эксперименты показали, что органно-системная субхроническая токсичность и, связанная с нею полиорганный генотоксичность, могут быть существенно ослаблены, если интоксикация развивается на фоне перорального назначения многокомпонентных биопрофилактических комплексов (БПК), в состав которых (подобранный с учетом как общих токсикокинетических и токсикодинамических механизмов действия металлсодержащих НЧ, так и специфики действия конкретного металла) входят пектин, поливитаминно-полиминеральные препараты, препараты отдельных витаминов и микроэлементов, некоторые аминокислоты и ПНЖК класса омега-3.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены наиболее общие закономерности вредного действия на организм наночастиц, влияние их химической природой, размера, растворимости и способности к пенетрации через клеточные мембраны, на особенности их биологической агрессивности на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях:

- при сопоставимом размере металлосодержащих наночастиц цитотоксичность и системная токсичность зависят от их химической природы, включая специфические токсические эффекты, характерные для этого металла. В частности, наночастицы магнетита вызывают повышение общего числа эритроцитов, содержания гемоглобина, числа ретикулоцитов (при введении магнетита 10 нм – в 5 раз, при введении 50 нм – в 3 раза), повышение в 1,5 раза уровня малонового диальдегида в сыворотке крови; после ингаляции наночастиц оксида никеля наблюдали активацию реакции специфического лизиса лейкоцитов ($15,84 \pm 2,28$) по сравнению с контролем ($7,56 \pm 0,74$), которая связана со свойством никеля как аллергена;

- изученные наночастицы вызывают однотипные ультраструктурные изменения клеток, такие как повреждение митохондрий с частичной или полной потерей крист, вакуолизация цитоплазмы, образование в ней концентрических мембранных включений, в мозгу – участки демиелинизации нервных волокон, однако возможна разница в распределении внутри фагоцитоспособных клеток наночастиц различной химической природы (наночастицы серебра имеют большую тропность к митохондриям, но меньшую способность к пенетрации внутрь ядра, чем наночастицы золота);

- наночастицы, всех изученных металлов обладают генотоксическим действием *in vivo*, которое проявляется увеличением коэффициента фрагментации ядерной ДНК различных органов и тканей даже при таком низком уровне экспозиции, при котором их системное токсическое действие на организменном уровне мало выражено;

- задержка и распределение металлических и металлооксидных наночастиц в организме управляются как физиологическими, так и физико-химическими процессами, а именно зависят от цитотоксичности, высокой способностью наночастиц к диффузионному проникновению через мембраны, наряду с активным эндоцитозом, осуществляемым различными клетками, и постепенным растворением *in vivo*. Относительный вклад перечисленных механизмов в эти токсикокинетические процессы для разных наночастиц неодинаков в зависимости от их размера и химического состава

результатом чего является неодинаковое накопление даже равноразмерных наночастиц в организме (например, при внутрибрюшинном введении равноразмерных наночастиц Ag и Au, более растворимые и более цитотоксичные серебра накапливается в печени ($0,12 \pm 0,01$ мг на г сухой массы) в меньшем количестве, чем золото $0,20 \pm 0,02$ мг ($P < 0,01$);

- наночастицы обладают более выраженным вредным действием как на клеточном, так и на органно-системном уровне по сравнению с микрочастицами соответствующего химического состава, внутри нанометрового диапазона зависимость токсичности от размера (при заданной массовой дозе) различна для качественно разных эффектов;

2. Рассмотрены общие принципы гигиенической регламентации наночастиц на основании полученных экспериментальных данных, которые позволяют утверждать, что:

- организм не защищен и по отношению к металлсодержащим наночастицам, поэтому установление нормативов типа ПДК или ОБУВ для содержания наночастиц не менее оправдано, чем для содержания микрочастиц;

- такие нормативы по общетоксическому действию должны быть существенно ниже установленных для микрочастиц той же химической природы;

- необходимо учитывать такие свойства наночастиц как химическая природа, размер, растворимость и способность к пенетрации через клеточные мембраны в связи с влиянием на особенности их токсического действия;

- наночастицы могут нормироваться без подразделения по суб-фракциям нанодиапазона;

3. Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что реагирование защитно-компенсаторных механизмов организма на наночастицы в основном имеет общие закономерности, как и на микрочастицы (например, активация реакции альвеолярного фагоцитоза), что обуславливает возможность использования аналогичных подходов к установлению допустимых уровней загрязнения воздуха металлсодержащими наночастицами, в частности, подхода, основанного на экстраполяции и интерполяции с имеющим норматив микрометровым аналогом по химической природе;

4. В качестве одного из ускоренных методов *in vivo* для регламентации наночастиц рационально использовать сравнительную оценку реакции глубоких дыхательных путей по изменению цитологического (приток общей клеточности, абсолютное содержание нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов, их отношение, фагоцитарная активность) и биохимического состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа, полученной через 24 часа после интратрахеального или ингаляционного введения металлсодержащих

наночастиц в связи с тем, что наночастицы, которые более цитотоксичны для альвеолярных макрофагов, предположительно более цитотоксичны и для любых других клеток, внутрь которых они попадают;

5. На основе экспериментальных данных проведенного хронического ингаляционного эксперимента обоснована и утверждена среднесменная предельно допустимая концентрация наночастиц диЖелезо триоксида в воздухе рабочих помещений $0,4 \text{ мг/м}^3$;

6. Многокамерная модель, учитывающая как физиологические механизмы элиминации из легких и внутрилегочной транслокации, так и кинетики растворения *in vivo* металлосодержащих наночастиц (относительный вклад последнего может быть различным для наночастиц разной химической природы), дает адекватное математическое описание задержки металлических наночастиц в легких при хронической ингаляционной экспозиции;

7. Резистентность организма к цитотоксичности, системной токсичности и генотоксичности металлосодержащих наночастиц может быть существенно повышена с помощью комплекса биопротекторов, подобранных с учетом как специфики действия конкретного металла, так и общих токсикокинетических и токсикодинамических механизмов вредного действия таких наночастиц, что позволяет использовать биологическую профилактику как один из методов управления риском здоровью, создаваемым металлическими наночастицами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Учитывать в работе органов и организаций Роспотребнадзора внесенную в ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимая концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны» от 13.02.2018 среднесменную концентрацию «диЖелезо триоксид» наночастицы $0,4 \text{ мг/м}^3$.

Для обоснования гигиенических нормативов содержания наночастиц в воздухе рабочих помещений можно использовать подход, базирующийся на экстраполяции и интерполяции в рядах с имеющим норматив микрометровым аналогом по химической природе.

Использовать оценку реакции альвеолярного фагоцитоза на действие НЧ в качестве одного из ускоренных методов для сравнительной оценки токсичности НЧ *in vivo* в более общем значении этого термина.

Результаты экспериментальной апробации биопрофилактического комплекса, понижающего токсическое, цитотоксическое и генотоксическое действие НЧ CuO позволяют

обосновать целесообразность использования тех же биопротекторов в целях биологической профилактики хронических профессиональных и производственно обусловленных заболеваний у рабочих, занятых в производстве черновой меди. Оценка эффективности такого курса биопрофилактики должна проводиться на основании клинико-лабораторного обследования непосредственно перед началом курса и сразу после его окончания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Сравнительная оценка реакции альвеолярного фагоцитоза на интратрахеальное введение частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазонов / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, Т.Д. Дегтярева, **М.П. Сутункова**, О.С. Еременко, М.Я. Ходос, А.Н. Козицина, Н.А. Малахова, Ю.А. Глазырина // Медицина труда и промышленная экология. – 2010. – № 2. – С. 12-16.
2. Экспериментальные данные к оценке пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазонов / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, С.В. Кузьмин, Т.Д. Дегтярева, **М.П. Сутункова**, Минигалиева И.А., Еременко О.С., Киреева Е.П., Ходос М.Я., Козицина А.Н., Н.А. Малахова, Ю.А. Глазырина, В.Я. Шур, Е.И. Шишкин, Е.В. Николаева, И.Е. Валамина // Токсикологический вестник. – 2010. – № 2. – С. 18-25.
3. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe_3O_4) suspensions with different particles size in nanometer and micrometer ranges – are we defenseless against nanoparticles? / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, S.V. Kuzmin, T.D. Degtyareva, **M.P. Sutunkova**, O.S. Yeremenko, M.Y. Khodos, A.N. Kositsina, N.A. Malakhova, J.A. Glazyrina, V.J. Shur, E.I. Shishkin, E.V. Nikolayeva // International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health. – 2010. – Vol.16 (4). – P. 503-519.
4. К сравнительной характеристике токсичности и опасности частиц разного размера в нано - и микрометровом диапазонах / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, Т.Д. Дегтярева, С.В. Кузьмин, **М.П. Сутункова**, И.А. Минигалиева, О.С. Еременко, Е.П. Киреева, М.Я. Ходос, А.Н. Козицина, В.Я. Шур, Е.В. Николаева, И.Е. Валамина, Я.Б. Бейкин, Л.Г. Тулакина // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5 (218). – С. 26-31.
5. Анализ некоторых результатов экспериментального изучения токсикологии наночастиц с позиции гигиенического нормирования / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, Т.Д. Дегтярева, С.В. Кузьмин, В.Б. Гурвич, **М.П. Сутункова**, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, О.С. Еременко // Уральский медицинский журнал. – 2011. – № 9. – С. 35-38.
6. Combined subchronic fluoride-lead intoxication and its attenuation with the help of a complex of bioprotectors / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, Y.P. Kireyeva, O.S. Yeremenko, **M.P. Sutunkova**, I.E. Valamina, A.N. Varaksin, V.G. Panov, J.I. Kazmer // Medicina del Lavoro. – 2012. – Vol.103(2). – P.146-159.
7. К проблеме обоснования ориентировочных безопасных уровней воздействия металлосодержащих наночастиц в воздухе рабочей зоны / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова,

Т.Д. Дегтярева, С.В. Кузьмин, В.Б. Гурвич, **М.П. Сутункова**, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, О.С. Еременко // Токсикологический вестник. – 2012. – № 4. – С. 26-29.

8. Сравнительно-экспериментальная оценка действия равноразмерных наночастиц серебра и золота на фагоцитирующие клетки глубоких дыхательных путей / Л.И. Привалова, **М.П. Сутункова**, С.В. Пичугова, Б.А. Кацнельсон, Л.Г. Тулакина, Я.Б. Бейкин, В.Я. Шур // Медицина труда и промышленная экология. – 2012. – № 11. – С. 42-46.

9. О сравнительной генотоксичности наносеребра и нанозолота и возможности ее снижения комплексом биопротекторов / Б.А. Кацнельсон, О.Г. Макеев, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, **М.П. Сутункова**, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, Н.В. Логинова, А.В. Коротков, М.С. Васильева, Е.А. Шуман, Л.А. Власова, В.Я. Шур, А.Е. Тюрнина, Р.В. Козин // Токсикологический вестник. – 2013. – № 2. – С. 20-25.

10. Цитологические и биохимические особенности жидкости, получаемой при бронхоальвеолярном лаваже у крыс после интратрахеального введения наноразмерных меднооксидных частиц / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, Н.В. Логинова, В.Б. Гурвич, В.Я. Шур, Я.Б. Бейкин, **М.П. Сутункова**, И.А. Минигалиева, Е.В. Шишкина, С.В. Пичугова, Л.Г. Тулакина, С.В. Беляева, В.О. Рузаков // Токсикологический вестник. – 2014. – № 5. – С. 8-13.

11. Пат. 2530639 Рос. Федерация: МПК А61К 31/195; А61К 33/04; А61К 33/38; А61К 35/60; А61Р 43/00. Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наносеребра на организм / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, О.Г. Макеев, В.Я. Шур, **М.П. Сутункова**, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, Н.В. Логинова, И.Е. Валамина; заявитель и патентообладатель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. – № 2013125265; заявл. 30.05.2013; опубл. 10.10.2014, Бюл. № 28.

12. О роли биопрофилактики в системе мер управления профессиональными и экологически обусловленными химическими рисками для здоровья населения / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, С.В. Кузьмин, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, **М.П. Сутункова**, Н.В. Логинова, О.Л. Малых, С.В. Ярушин, Ю.И. Солобоева // Токсикологический вестник. – 2015. – № 1. – С. 10-21.

13. Пути повышения устойчивости организма к вредному действию наноматериалов на примере наносеребра и наноксида меди / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, Н.В. Логинова, В.Б. Гурвич, В.Я. Шур, О.Г. Макеев, И.Е. Валамина, **М.П. Сутункова**, И.А. Минигалиева, Е.П. Киреева // Гигиена и санитария. – 2015. – Т.94, № 2. – С. 31-35.

14. Основные результаты токсикологических экспериментов «ин vivo» с некоторыми металлическими и металлооксидными наночастицами / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, **М.П. Сутункова**, В.Б. Гурвич, И.А. Минигалиева, Н.В. Логинова, Е.П. Киреева, В.Я. Шур,

Е.В. Шишкина, Я.Б. Бейкин, С.В. Пичугова, О.Г. Макеев, И.Е. Валамина // Токсикологический вестник. – 2015. – № 3. – С. 21-25.

15. Пат. 2560682 Рос. Федерация: МПК А61К 35/00; В82В 1/00. Способ профилактики вредных эффектов общетоксического и генотоксического действия наночастиц оксида меди на организм / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, О.Г. Макеев, В.Я. Шур, **М.П. Сутункова**, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, Н.В. Логинова, И.Е. Валамина; заявитель и патентообладатель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. – № 2014135245; заявл. 28.08.2014; опубл. 20.08.2015, Бюл. № 23.

16. О некоторых принципах и способах повышения резистентности организма к вредным эффектам металлсодержащих наночастиц / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, В.Б. Гурвич, И.А. Минигалиева, **М.П. Сутункова**, О.Г. Макеев, И.Е. Валамина, В.Я. Шур, Е.В. Григорьева, С.В. Клинова, Е.В. Шишкина // Токсикологический вестник. – 2016. – № 6 (141). – С. 4-10.

17. **Сутункова М.П.** Экспериментальные данные и методические соображения к обоснованию предельно допустимой концентрации железо-оксидных наночастиц в воздухе рабочей зоны / **М.П. Сутункова** // Токсикологический вестник. – 2016. – № 6 (141) – С.11-17.

18. Повышение резистентности организма к вредному действию металлсодержащих наночастиц как перспективный подход к управлению рисками для здоровья / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, **М.П. Сутункова**, И.А. Минигалиева, В.Б. Гурвич, В.Я. Шур, О.Г. Макеев, И.Е. Валамина // Медицина труда и промышленная экология – 2016. – № 10. – С.29-32.

19. Пат. 100783 Рос. Федерация: МКПО 19-07; 19-08. Схема многокамерной модели кинетики металлсодержащего нановещества в легочной области / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, **М.П. Сутункова**, Л.К. Коньшева; заявитель и патентообладатель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. – № 2015502264; заявл. 01.07.2015; опубл. 16.12.2016.

20. Экспериментальное и математическое моделирование кинетики задержки наночастиц оксида железа в легких при хронической низкоуровневой ингаляционной экспозиции / **М.П. Сутункова**, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, Л.К. Коньшева, В.Я. Шур, Е.В. Шишкина, И.А. Минигалиева, С.Н. Соловьева, И.В. Зубарев // Токсикологический вестник. – 2017. – № 2. – С.12-21.

21. **Сутункова М.П.** Экспериментальное изучение токсического действия металлсодержащих наночастиц на предприятиях черной и цветной металлургии и оценка риска для здоровья работающих / **М.П. Сутункова** // Гигиена и санитария. – 2017. – № 96(12). – С. 1182-1187.

22. Биопрофилактика в системе управления профессиональными рисками, связанными с воздействием металлсодержащих наночастиц / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, И.А. Минигалиева, **М.П. Сутункова**, О.Г. Макеев, И.Е. Валамина, В.Я. Шур, С.В. Клинова, С.Н. Соловьева // Гигиена и санитария. – 2017. – № 96(12). – С. 1187-1191.

23. Пат. 105244 Рос. Федерация: МКПО 19-07. Структура многокамерной модели кинетики распределения и задержки в организме металлсодержащих наночастиц, отложившихся в глубоких дыхательных путях / **М.П. Сутункова**; заявитель и патентообладатель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. – № 2016505315; заявл. 22.12.2016; опубл. 05.10.2017.

24. Генотоксический эффект воздействия некоторых элементных или элементнооксидных наночастиц и его ослабление комплексом биопротекторов / **М.П. Сутункова**, О.Г. Макеев, Л.И. Привалова, И.А. Минигалиева, В.Б. Гурвич, С.Н. Соловьева, С.В. Клинова, В.О. Рузаков, А.В. Коротков, Е.А. Шуман, Б.А. Кацнельсон // Медицина труда и промышленная экология. – 2018. – № 11. – С. 10-16.

25. Оценка токсических эффектов наночастиц оксида никеля при ингаляционных воздействиях / Б.А. Кацнельсон, **М.П. Сутункова**, Л.И. Привалова, С.Н. Соловьева, В.Б. Гурвич, Т.В. Бушуева, Р.Р. Сахаутдинава, И.Е. Валамина, О.Г. Макеев, И.В. Зубарев, И.А. Минигалиева, С.В. Клинова, В.Я. Шур, Ю.В. Грибова, А.Е. Царегородцева, А.В. Коротков, Е.А. Шуман, Е.В. Шишкина // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 12(309). – С. 24-29.

26. Экспериментальная оценка токсичности наночастиц оксида никеля двух размеров в субхроническом эксперименте / **М.П. Сутункова**, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, С.Н. Соловьева, В.Б. Гурвич, И.А. Минигалиева, С.В. Клинова, Т.В. Бушуева, В.Я. Шур, И.Е. Валамина, А.Е. Царегородцева, Е.В. Шишкина // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 12(309). – С. 30-35.

27. Пат. 2642674 Рос. Федерация: МПК А61К 31/198; А61К 31/202; А61К 35/60; А61К 31/732; А61Р 39/00. Способ повышения устойчивости организма к комбинированному токсическому действию наночастиц оксидов меди, цинка и свинца / И.А. Минигалиева, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, **М.П. Сутункова**, В.Я. Шур, Е.В. Шишкина, И.Е. Валамина, И.В. Зубарев, О.Г. Макеев, Е.Ю. Мещерякова; заявитель и патентообладатель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. – № 2017105946; заявл. 21.02.2017; опубл. 25.01.2018, Бюл. № 3.

28. **Сутункова М.П.** Оценка токсического действия наночастиц NiO при ингаляционном поступлении / **М.П. Сутункова** // Медицина труда и промышленная экология. – 2019. – № 59(2). – С.86-91.

Публикации в других научных изданиях

29. Оценка клеточной реакции глубоких дыхательных путей на отложение наночастиц ферромагнетита / **М.П. Сутункова**, И.А. Минигалиева, Е.П., Киреева О.С. Еременко // Современные вопросы профилактической медицины: Сб. науч. тр. молодых ученых. – Екатеринбург, 2009. – С. 216-222.

30. Электронно-микроскопическое исследование легочных макрофагов при взаимодействии с наночастицами Fe_3O_4 / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, Л.Г. Тулакина, С.В. Пичугова, **М.П. Сутункова**, М.Я. Ходос // Лабораторная диагностика в клинике инфекционной и соматической патологии: Сб. науч. тр. – Екатеринбург, 2010. – С. 211-215.

31. Experimental Estimates of the Toxicity of Iron Oxide Fe_3O_4 (Magnetite) Nanoparticles / В.А. Katsnelson, L.I. Privalova, T.D. Degtyareva, **M.P. Sutunkova**, I.A. Minigalieva, O.S. Yeremenko, E.P. Kireeva, M.Ya. Khodos, A.N. Kozitsina, N.A. Malakhova, Yu.A. Glazyrina, V.Ya. Shur, E.V. Nikolaeva, V.A. Vazhenin, A.P. Potapov, M.V. Morozova, I.E. Valamina, L.G. Tulakina, S.V. Pichugova, J.B. Beikin // International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health. – 2010. – Vol. 16 (1-2). – P. 47-63.

32. Биологическая профилактика экологически обусловленных нарушений здоровья: теоретические предпосылки, экспериментальные данные, оценка эффективности, практическая реализация / Б.А. Кацнельсон, Т.Д. Дегтярева, Л.И. Привалова, Ю.И. Солобоева, Е.П. Киреева, И.А. Минигалиева, **М.П. Сутункова**, О.С. Еременко, О.Ю. Береснева, Н.И. Кочнева // Биосфера. – 2010. – Т.2 (3). – С. 375-385.

33. Sub-chronic systemic toxicity and bio-accumulation of Fe_3O_4 nano- and micro-particles following repeated intraperitoneal administration to rats / В.А. Katsnelson, T.D. Degtyareva, I.A. Minigalieva, L.I. Privalova, S.V. Kuzmin, O.S. Yeremenko, E.P. Kireyeva, **M.P. Sutunkova**, I.I. Valamina, M.Y. Khodos, A.N. Kozitsina, V.Y. Shur, V.A. Vazhenin, A.P. Potapov, M.V. Morozova // International Journal of Toxicology. – 2011. – Vol. 30 (1). – P. 60-68.

34. Сравнительная оценка клеточной реакции глубоких дыхательных путей на отложение в них микро- и наночастиц / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, **М.П. Сутункова**, М.Я. Ходос, А.Н. Козицина, В.Я. Шур, Е.В. Николаева, Л.Г. Тулакина, С.В. Пичугова, Я.Б. Бейкин // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2011. – Т. III, № 3 (8). – С. 42-48.

35. Is health risk due to nanoparticles unusually great and are they really ignored by physiological defense mechanisms? / S.V. Kuzmin, В.А. Katsnelson, L.I. Privalova, **M.P. Sutunkova**, O.S. Yeremenko, M.Y. Khodos, V.Y. Shur // Epidemiology. – 2011. – Vol. 22 (1). – P. 254.

36. Взаимодействие наночастиц оксида железа Fe_3O_4 и альвеолярных макрофагов «ин vivo» / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, **М.П. Сутункова**, Л.Г. Тулакина, С.В.

Пичугова, Я.Б. Бейкин, М.Я. Ходос // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 11. – С. 560-563.

37. An approach to tentative reference levels setting for nanoparticles in the workroom air based on comparing their toxicity with that of their micrometric counter-parts: a case study of iron oxide Fe_3O_4 / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, S.V. Kuzmin, V.B. Gurvich, **M.P. Sutunkova**, E.P. Kireyeva, I.A. Minigalieva // Nanotechnology. – 2012. – Vol. 1. – P. 12.

38. Uptake of some metallic nanoparticles by, and their impact on pulmonary macrophages *in vivo* as viewed by optical, atomic force, and transmission electron microscopy / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, **M.P. Sutunkova**, M.Y. Khodos, V.Y. Shur, E.V. Shishkina, L.G. Tulakina, S.V. Pichugova, J.B. Beikin // Journal of Nanomedicine & Nanotechnology. – 2012. – Vol. 3 (1). – P. 1-8.

39. Comparative *in vivo* Assessment of Some Adverse Bioeffects of Equidimensional Gold and Silver Nano-particles and the Attenuation of Nanosilver's Effects with a Complex of Innocuous Bioprotectors / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, V.B. Gurvich, O.H. Makeyev, V.Ya. Shur, Ya.B. Beikin, **M.P. Sutunkova**, E.P. Kireyeva, I.A. Minigalieva, N.V. Loginova, M.S. Vasilyeva, A.V. Korotkov, E.A. Shuman, L.A. Vlasova, E.V. Shishkina, A.E. Tyurnina, R.V. Kozin, I.E. Valamina, S.V. Pichugova, L.G. Tulakina // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14. – P. 2449-2483.

40. Subchronic Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles and Its Attenuation with the Help of a Combination of Bioprotectors / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, N.V. Loginova, V.B. Gurvich, V.Y. Shur, I.E. Valamina, O.H. Makeyev, **M.P. Sutunkova**, I.A. Minigalieva, E.P. Kireyeva, V.O. Rusakov, A.E. Tyurnina, R.V. Kozin, E.Y. Meshtcheryakova, A.V. Korotkov, E.A. Shuman, A.E. Zvereva, S.V. Kostykova // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – Vol. 15(7). – P. 12379-12406.

41. Some characteristics of free cell population in the airways of rats after intratracheal instillation of copper-containing nanoscale particles / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, N.V. Loginova, V.B. Gurvich, Ya.V. Shur, Y.B. Beikin, **M.P. Sutunkova**, I.A. Minigalieva, E.V. Shishkina, S.V. Pichugova, L.G. Tulakina, S.V. Beljaeva // International Journal of Molecular Sciences. Special issue «Bioactive nanoparticles». – 2014. – Vol. 15(11). – P. 31538-21553.

42. Enhancing population's resistance to toxic exposures as an auxiliary tool of decreasing environmental and occupational health risks (a self-overview) / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, V.B. Gurvich, S.V. Kuzmin, E.P. Kireyeva, I.A. Minigalieva, **M.P. Sutunkova**, N.V. Loginova, S.V. Yarushin, J.I. Soloboyeva, N.I. Kochneva // Journal of Environmental Protection. – 2014. – Vol. 5. – P. 1435-1449.

43. Some inferences from *in vivo* experiments with metal and metal oxide nanoparticles: the pulmonary phagocytosis response, subchronic systemic toxicity and genotoxicity, regulatory proposals, searching for bioprotectors (a self-overview) / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, **M.P. Sutunkova**, V.B. Gurvich, I.A. Minigalieva, N.V. Loginova, E.P. Kireyeva, V.Ya. Shur, E.V. Shishkina, Ya. B. Beikin, O.H. Makeyev, I.E. Valamina // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 3013-3029.

44. Is it possible to enhance the organism's resistance to toxic effects of metallic nanoparticles ? / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, **M.P. Sutunkova**, I.A. Minigalieva, V.B. Gurvich, V.Y. Shur, O.H. Makeyev, I.E. Valamina, E.V. Grigoryeva // *Toxicology*. – 2015. – Vol. 337. – P. 79-82.

45. 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 / **M.P. Sutunkova**, B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, V.B. Gurvich, L.K. Konysheva, V.Ya. Shur, E.V. Shishkina, I.A. Minigalieva, S.N. Solovjeva, S.V. Grebenkina, I.V. Zubarev // *Toxicology*. – 2016. – Vol. 363-364(1). – P. 19-28.

46. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity *in vivo* / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, **M.P. Sutunkova**, I.A. Minigalieva, V.B. Gurvich, V.Ya. Shur, E.V. Shishkina, O.H. Makeyev, I.E. Valamina, A.N. Varaksin, V.G. Panov // *Bioactivity of Engineered Nanoparticles*. – Springer, 2017. – Ch.11. – P. 259-319.

47. Looking for biological protectors against adverse health effects of some nanoparticles that can pollute workplace and ambient air (a summary of authors' experimental results) / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, **M.P. Sutunkova**, I.A. Minigalieva, V.B. Gurvich, O.H. Makeyev, V.Ya. Shur, I.E. Valamina, S.V. Klinova, E.V. Shishkina, I.V. Zubarev // *Journal of Environmental Protection*. – 2017. – Vol. 8. – P. 844-866.

48. The most important inferences from the Ekaterinburg nanotoxicology team's animal experiments assessing adverse health effects of metallic and metal oxide nanoparticles / **M.P. Sutunkova**, L.I. Privalova, I.A. Minigalieva, V.B. Gurvich, V.G. Panov, B.A. Katsnelson // *Toxicology Reports*. – 2018. – Vol. 5. – P. 363-376.

49. Consequent stages of developing a multi-compartmental mechanistic model for chronically inhaled nanoparticles pulmonary retention / B.A. Katsnelson, **M.P. Sutunkova**, L.K. Konysheva, S.N. Solovyeva, I.A. Minigalieva, V.B. Gurvich, L.I. Privalova // *Toxicology Reports*. – 2019. – № 6. – P. 279-287.

50. Toxic effects of low-level long-term inhalation exposures of rats to nickel oxide nanoparticles / **M.P. Sutunkova**, S.N. Solovyeva, I.A. Minigalieva, V.B. Gurvich, I.E. Valamina, O.H. Makeyev, V.Ya. Shur, E.V. Shishkina, I.V. Zubarev, R.R. Saatkudinova, S.V. Klinova, A.E.

Tsaregorodtseva, A.E. Korotkov, E.A. Shuman, L.I. Privalova, B.A. Katsnelson // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – 7(20). – P. 1-24.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМ – альвеолярные макрофаги

БПК – биопрофилактический комплекс

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МДА – малоновый диальдегид

НЛ – нейтрофильные лейкоциты

ПДАФ – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

Научное издание

Сутункова Марина Петровна

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

14.02.01 – гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Подписано в печать _____. Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. _____. Тираж 100 экз. Заказ № _____

Отпечатано в типографии _____
Адрес: _____
