



Оценка острой токсичности наночастиц оксида свинца на крысах при ингаляционной экспозиции

М.П. Сутункова, И.А. Минигалиева, С.В. Клинова, Ю.В. Рябова, А.В. Тажигулова, Л.В. Шабардина, В.А. Батенева, И.Г. Шеломенцев, Л.И. Привалова

ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, ул. Попова, д. 30, г. Екатеринбург, 620014, Российская Федерация

Резюме

Введение. Наночастицы оксида свинца образуются в ходе высокотемпературных процессов на металлургических предприятиях и выделяются в атмосферный воздух, что обуславливает высокую вероятность их попадания в организм через дыхательные пути. Несмотря на широко изученное токсическое действие свинца и его наноразмерных соединений на нервную, кроветворную, почечную и репродуктивную системы, данные об особенностях острого ингаляционного воздействия его наночастиц по-прежнему ограничены.

Цель исследования: изучение острой токсичности наночастиц оксида свинца при ингаляционном поступлении в условиях эксперимента на крысах.

Материал и методы. Эксперимент проводился на аутбредных крысах-самках массой $247,9 \pm 10,5$ г, разделенных на две группы по 10 животных в каждой. Первая группа была контрольной, вторая подвергалась воздействию НЧ PbO (II) размером $18,2 \pm 4,2$ нм в концентрации $0,215$ мг/м³ в течение 4 часов. На следующий день после ингаляционного воздействия у крыс проводился забор крови из хвостовой вены для оценки гематологических показателей и бронхоальвеолярной жидкости для оценки цитологических и биохимических показателей.

Результаты. После ингаляционного воздействия наночастиц оксида свинца в крови наблюдали увеличение количества гранулоцитов и компенсаторное усиление эритропоэза, которое проявилось в виде значительного увеличения доли ретикулоцитов. В жидкости бронхоальвеолярного лаважа наблюдалась выраженная клеточная реакция глубоких дыхательных путей, сопровождающаяся увеличением как числа нейтрофильных лейкоцитов, так и соотношения числа нейтрофильных лейкоцитов к альвеолярным макрофагам, что является показателем их цитотоксического действия.

Заключение. Ингаляционное воздействие наночастиц оксида свинца в указанной дозе вызывает проявления как общетоксического, так и цитотоксического действия. Вышеизложенное обосновывает необходимость дальнейших исследований, нацеленных на определение недействующей концентрации для наночастиц оксида свинца.

Ключевые слова: наночастицы, оксид свинца, токсичность, ингаляционная экспозиция, эксперимент.

Для цитирования: Сутункова М.П., Минигалиева И.А., Клинова С.В., Рябова Ю.В., Тажигулова А.В., Шабардина Л.В., Батенева В.А., Шеломенцев И.Г., Привалова Л.И. Оценка острой токсичности наночастиц оксида свинца на крысах при ингаляционной экспозиции // Здоровье населения и среда обитания. 2023. Т. 31. № 9. С. 24–30. doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-9-24-30

Acute Toxicity Induced by Inhalation Exposure to Lead Oxide Nanoparticles in Rats

Marina P. Sutunkova, Ilzira A. Minigalieva, Svetlana V. Klinova, Yuliya V. Ryabova, Anastasia V. Tazhigulova, Lada V. Shabardina, Vlada A. Bateneva, Ivan G. Shelomentsev, Larisa I. Privalova

Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 30 Popov Street, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation

Summary

Introduction: Lead oxide nanoparticles are generated during high-temperature processes at metallurgical plants and emitted in the atmosphere, thus posing high risks of human inhalation exposures. Despite a well-known toxic effect of lead and its nano-sized compounds on the nervous, hematopoietic, urinary, and reproductive systems, data on specific features of an acute inhalation exposure to its nanoparticles are still scarce.

Objective: To conduct an experimental study of acute toxicity induced by inhalation exposure to lead oxide nanoparticles in rats.

Materials and methods: The experiment was carried out on outbred female rats with the body weight of 247.9 ± 10.5 g divided into two (exposure and control) groups of 10 animals each. A single inhalation exposure to lead oxide nanoparticles (PbO NPs) at the concentration of 0.215 mg/m³ lasted four hours. The nanoparticle shape was spherical with a mean diameter of 18.2 ± 4.2 nm. Blood was taken from the tail vein of the rats to assess its hematologic parameters while the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was obtained to establish its cytological and biochemical characteristics 24 hours after the exposure.

Results: After the single inhalation exposure to PbO NPs, the results of the complete blood count showed an increased granulocyte count and a compensatory increase in erythropoiesis manifested by a significant growth of the reticulocyte percentage. The BALF analysis demonstrated that the exposure induced a pronounced cellular reaction in the lower airways accompanied by an increase in the neutrophil count and the neutrophil to alveolar macrophage ratio, which is an indicator of the cytotoxic effect of PbO NPs.

Conclusion: Inhalation exposure to PbO NPs at the experimental dose causes both general toxic and cytotoxic effects. The foregoing justifies the necessity of further studies aimed at establishing a no-effect concentration for lead oxide nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, lead oxide, toxicity, inhalation exposure, experiment.

For citation: Sutunkova MP, Minigalieva IA, Klinova SV, Ryabova YuV, Tazhigulova AV, Shabardina LV, Bateneva VA, Shelomentsev IG, Privalova LI. Acute toxicity induced by inhalation exposure to lead oxide nanoparticles in rats. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2023;31(9):24–30. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-9-24-30

Введение. Свинец, будучи известным загрязнителем среды обитания на протяжении тысячелетий, продолжает и сегодня оставаться угрозой для здоровья человека.

В результате производственной деятельности человека образуются аэрозоли сложного состава, включающие ультратонкую фракцию. Их источниками являются многие производственные процессы, например сварочные работы, различные этапы обработки металлов на металлургических предприятиях. Ультратонкие частицы наноразмерного диапазона (наночастицы – НЧ) составляют значительную долю загрязняющих аэрозолей, что обуславливает высокую вероятность их попадания в организм через дыхательные пути [1]. Кроме того, существует вероятность неблагоприятного воздействия на организм человека наночастиц природного происхождения, образующихся в результате лесных пожаров, вулканических выбросов.

Широко изучено токсическое действие свинца и его наноразмерных соединений на нервную [2], кроветворную [3] и репродуктивную системы [4], на состояние почек [5], но данные об особенностях острого ингаляционного воздействия его наночастиц по-прежнему ограничены.

В исследовании Lebedeva и соавт. (2018) установлено, что острое 4-часовое ингаляционное воздействие на мышей НЧ PbO в концентрации 40,6 мг/м³ вызывает накопление НЧ в легких: альвеолярных эпителиальных клетках типа I, макрофагах и нейтрофилах. Увеличивалось количество макрофагов в альвеолярных пространствах легких, уровень глутатион-S-трансферазы повысился. Уровень окисленного глутатиона снизился в легких через 12 ч после воздействия [6].

Bláhová и соавт. (2020) в исследованиях на мышах выявили, что при воздействии наночастиц оксида свинца (НЧ PbO) (192,5 мкг/м³; $1,93 \times 10^6$ частиц/см³) в течение 2 недель путем непрерывной ингаляции происходит перераспределение Pb из легких в почки и печень. Гистопатологические изменения, наблюдаемые в основном в легких и печени, указывали на воспалительные реакции и проявления токсичности [7].

В условиях экспериментального исследования на белых мышах линии ICR, непрерывно подвергавшихся воздействию аэрозоля НЧ PbO в ингаляционной установке типа «все тело» в течение 6 недель со средней концентрацией 121,7 мкг/м³, Dumková и соавт. (2018) заключили, что вдыхание наночастиц оксида свинца оказывает множественное негативное воздействие на легкие мыши как основной орган-мишень. В альвеолах было обнаружено повышенное количество нейтрофилов и макрофагов. В бронхиолах наблюдалось повышенное выделение слизи, десквамированные эпителиальные клетки, нейтрофилы и единичные эритроциты. Вдыхание наночастиц PbO также вызвало обширную периваскулярную и перибронхиолярную инфильтрацию лимфоцитов, характерную для субхронического воспаления [8].

Ранее нашим коллективом проводилось изучение ингаляционного воздействия аэрозоля наночастиц оксида свинца в концентрации $1,30 \pm 0,10$ мг/м³

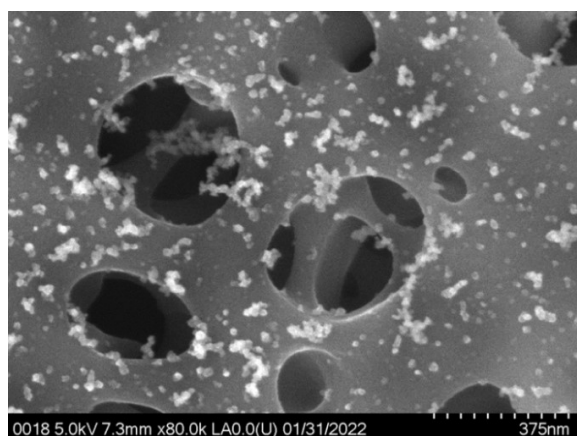
в течение 5 дней по 4 часа в день в установке «только нос». Наблюдался типичный приток нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов на поступление наночастиц в легкие. Показана задержка наночастиц в легких и обонятельных луковицах крыс. Помимо этого, в опытной группе выявлены нарушения, характерные для воздействия свинца (увеличение доли ретикулоцитов, выделение с мочой δ -аминолевулиновой кислоты и развитие артериальной гипертензии) [9].

Несмотря на то что дыхательная система является одним из основных путей проникновения НЧ PbO в организм человека, данные о его потенциальном остром ингаляционном воздействии в мировой научной литературе ограничены. Таким образом, **цель исследования** – изучение острой токсичности наночастиц оксида свинца при ингаляционном поступлении в условиях эксперимента на крысах. Научная новизна работы состоит в том, что впервые исследуется влияние наночастиц оксида свинца в концентрации 0,215 мг/м³ на лабораторных животных в условиях однократного воздействия. Ранее ряд авторов показали оценку экспозиции к НЧ PbO в сходной концентрации 192,5 мкг/м³ в подостром эксперименте [7], а в концентрации 121,7 мкг/м³ – субхроническом [8].

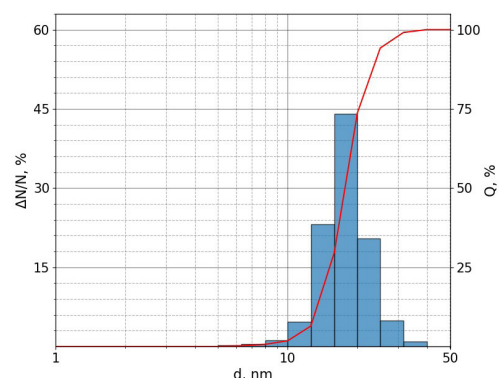
Материалы и методы. Наночастицы свинца генерировались с помощью электрического искрения из 99,99 % чистого свинцового стержня диаметром 5,6 мм в атмосфере азота. Поток полученных НЧ Pb, смешиваясь с воздухом (6 л/мин) для охлаждения, окислялся в наночастицы оксида свинца II (НЧ PbO), которые подавались в экспозиционную башню для воздействия «только нос» (CH Technologies, Westwood, NJ, USA) с крысами, помещенными в индивидуальные сдерживающие устройства (рестрейнеры). Для мнимого воздействия на контрольных крыс использовалась установка такой же конструкции, полученная от того же производителя.

Характеристики НЧ PbO представлены на рисунке. Химическая идентичность НЧ, отобранных на поликарбонатные фильтры, была определена как PbO с помощью Рамановской спектроскопии.

Эксперимент проводился на аутбредных крысах-самках исходной массой $247,9 \pm 10,5$ г. Животные были разделены на две группы по 10 животных в каждой. Первая группа была контрольной и дышала чистым нефилтрованным воздухом, вторая группа подвергалась воздействию НЧ PbO размером $18,2 \pm 4,2$ нм в концентрации 0,215 мг/м³ в течение 4 часов. Выбор концентрацией обусловлен задачей исследования – впервые изучить реакцию глубоких дыхательных путей у крыс в ответ на острое воздействие НЧ PbO. Эксперимент проводится в рамках работы, направленной на определение потенциально безопасных уровней воздействия наночастиц оксида свинца в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России».



А



В

Рисунок. Наночастицы оксида свинца в эксперименте: А – СЭМ-изображение (увеличение $\times 80\,000$); В – график распределения частиц по диаметру

Figure. Lead oxide nanoparticles in the experiment: А – a scanning electron microscopy (SEM) image ($80,000\times$ magnification); В – particle size distribution

Животных содержали в обособленном помещении вивария Центра, они дышали нефiltroванным воздухом, снабжались бутилированной артезианской водой и стандартным сбалансированным кормом. Эксперимент планировался и проводился в соответствии с документами¹.

На следующий день, через 24 часа по завершении ингаляционного воздействия, у крыс производили взятие бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) для анализа цитологических и биохимических показателей. Животным под эфирным рауш-наркозом выполнялся забор промывных вод из легких. В промывных водах с помощью меланжера отбирали пробу жидкости с клетками. Клетки подкрашивали метиленовым синим в 3 % уксусной кислоте. Методом световой микроскопии в камере Горяева подсчитывали общее число клеток в аликвотной пробе с последующим пересчетом на весь объем БАЛЖ. Далее БАЛЖ центрифугировали 4 мин. при 1000 об/мин (200 g). Надосадочную жидкость (НОЖ) отбирали для выполнения биохимического анализа по показателям: щелочная фосфатаза (ЩФ), амилаза, аспартат- и аланин-трансферазы (АСТ, АЛТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП). Клеточный осадок аккуратно ресуспендировали в небольшом количестве надосадочной жидкости и готовили наливные мазки. Их сушили на воздухе, фиксировали в метаноле, окрашивали азу-эозином. При световой микроскопии подсчитывали не менее 100 клеток на каждой мазке, идентифицируя альвеолярные макрофаги, нейтрофильные лейкоциты и эозинофилы.

Для определения содержания гемоглобина (HGB), гематокрита (HCT), тромбоцита (PCT), среднего

объема эритроцитов (MCV), подсчета эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC) и тромбоцитов (PLT) использовали автогематологический анализатор MYTHIC-18 (C2 Diagnostic, Montperlier, Франция), кровь собирали из хвостовой вены на следующий день после ингаляционного воздействия до взятия БАЛЖ. Процент ретикулоцитов подсчитывали на мазках на 1000 клеток с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Primo Star после суправитального окрашивания бриллиантовым крезильным синим.

Статистическую значимость различий между среднеарифметическими значениями показателей в группах оценивали с помощью t -теста Стьюдента. Значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Данные в статье представлены в виде: среднее $\pm$ стандартная ошибка.

Результаты. При цитологическом анализе БАЛЖ статистически значимые сдвиги в сравнении с контролем были отмечены по 60% из изученных показателей (табл. 1). В частности, отмечалось увеличение содержания нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) (в 2,6 раза, $p < 0,05$) и снижение числа альвеолярных макрофагов (АМ) (в 1,1 раза, $p < 0,05$). Главный показатель цитотоксического действия – отношение нейтрофилов к альвеолярным макрофагам – также увеличился по сравнению с контролем (в 2,9 раза, $p < 0,05$).

Несмотря на наличие выраженной клеточной реакции глубоких дыхательных путей, значимого изменения уровня некоторых ферментов в надосадочной жидкости бронхоальвеолярного лаважа не замечено (табл. 2). Наблюдаются тенденции к росту щелочной фосфатазы, аланин- и аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамилтранспептидазы и лактатдегидрогеназы.

¹ Международные руководящие принципы биомедицинских исследований с участием животных, разработанные Советом по международным организациям медицинских наук (1985). [Электронный ресурс] Режим доступа: http://arctica-ac.ru/docs/Redactsia/CIOMS_basic_RUS.pdf (дата обращения: 10 августа 2023 г.).

Р 1.2.3156–13 «Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека». Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2014. 639 с.

Протокол № 4 от 12.07.2022 Локального этического комитета Екатеринбургского медицинского-научного центра профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий.

Таблица 1. Цитологические показатели БАЛЖ через 24 часа после однократного ингаляционного воздействия аэрозолем НЧ оксида свинца ($\bar{X} \pm Sx$)**Table 1. Cytological characteristics of the bronchoalveolar lavage fluid 24 hours after a single inhalation exposure of the laboratory rats to lead oxide nanoparticles ($\bar{X} \pm Sx$)**

Группа / Group	Общая клеточность, 10^6 кл. / Total cellularity, 10^6 cells	НЛ, 10^6 кл. / NL, 10^6 cells	АМ, 10^6 кл. / AM, 10^6 cells	Лимфоциты, 10^6 кл. / Lymphocytes, 10^6 cells	НЛ/АМ / NL/AM ratio
Контроль / Control	$2,08 \pm 0,15$	$0,11 \pm 0,03$	$1,94 \pm 0,14$	$0,03 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$
Опыт / Exposure	$2,09 \pm 0,12$	$0,30 \pm 0,06^*$	$1,76 \pm 0,08^*$	$0,03 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,03^*$

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы (по t-критерию Стьюдента, $p \leq 0,05$).

Notes: * – statistically different from the control group ($p \leq 0.05$, Student's *t*-test).

Аббревиатуры: НЛ – нейтрофильные лимфоциты; АМ – альвеолярные макрофаги.

Abbreviations: NL, neutrophilic leukocytes; AM, alveolar macrophages.

Таблица 2. Биохимические показатели надосадочной жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс через 24 часа после однократной ингаляционной экспозиции НЧ оксида свинца ($\bar{X} \pm Sx$)**Table 2. Biochemical characteristics of the bronchoalveolar lavage fluid 24 hours after a single inhalation exposure of the laboratory rats to lead oxide nanoparticles ($\bar{X} \pm Sx$)**

Группа / Group	ЩФ, Е/л / AP, U/L	АлАТ, Е/л / ALT, U/L	Амилаза, Е/л / Amylase, U/L	АсАТ, Е/л / AST, U/L	ГГТП, Е/л / GGTP, U/L	ЛДГ, Е/л / LDH, U/L
Контроль / Control	$17,05 \pm 5,26$	$0,37 \pm 0,11$	$2,78 \pm 0,28$	$3,76 \pm 0,36$	$2,40 \pm 0,56$	$7,70 \pm 2,68$
Опыт / Exposure	$18,15 \pm 4,42$	$0,55 \pm 0,11$	$2,43 \pm 0,18$	$4,22 \pm 0,60$	$3,11 \pm 0,51$	$10,10 \pm 2,68$

Аббревиатуры: ЩФ, щелочная фосфатаза; АлАТ, аланинаминотрансфераза; АсАТ, аспаратаминотрансфераза; ГГТП, гамма-глутамилтранспептидаза; ЛДГ, лактатдегидрогеназа.

Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGTP, gamma-glutamyl transpeptidase; LDH, lactate dehydrogenase.

Из числа оцененных показателей крови крыс статистически значимые неблагоприятные сдвиги в сравнении с контролем были отмечены по 23 % из представленных показателей (табл. 3). К их числу относятся: увеличение абсолютного числа и относительного числа клеток крови среднего размера (в 1,9 и 1,6 раза соответственно, $p < 0,05$), рост абсолютного числа и относительного содержания гранулоцитов (в 1,8 и 1,6 раза соответственно, $p < 0,05$), увеличение ретикулоцитов (в 1,25 раза, $p < 0,05$).

Обсуждение. Попадание НЧ PbO в глубокие дыхательные пути вызывало увеличение фагоцитарной активности (рост числа НЛ и АМ в бронхоальвеолярной лаважной жидкости, изменение их соотношения), отраженное в табл. 1. АМ первыми начинают фагоцитировать чужеродные частицы, и продукты их разрушения привлекают НЛ. Чем более цитотоксичными оказываются чужеродные частицы – то есть, чем больше повреждений происходит под их влиянием в легочной ткани либо в популяции фагоцитирующих клеток, тем больший приток НЛ наблюдается [10].

Несмотря на полученное по результатам цитологической оценки цитотоксическое действие, поступление НЧ PbO не приводило к изменению биохимических параметров надосадочной жидкости БАЛ. ГГТП – мембраносвязанный фермент, который участвует в переносе глутаминовой части глутатиона к другим аминокислотам и дипептидам [11], остался в пределах контрольных значений. Не изменился уровень внутриклеточного гликолитического фермента ЛДГ, который используется для анализа целостности клеточной мембраны [12]. Наблюдалась незначительная тенденция к росту АСТ и АЛТ в надосадочной жидкости [13], указывающая на возможное повреждение клеток легочной ткани (табл. 2).

Такие изменения согласуются с результатами ранее проведенных исследований *in vivo* и принятой последовательностью реакции глубоких дыхательных путей на введение чужеродных частиц [14]. Так, при однократном интратрахеальном введении крысам-самкам НЧ PbO в дозе 0,2 и 0,5 мг на крысу наблюдали токсическое действие, которое также не сопровождалось выраженным изменением биохимического состава БАЛЖ [15]. Применение более высоких доз и ингаляционной 5-кратной экспозиции в концентрации $1,30 \pm 0,10$ мг/м³ уже вызывало изменение как цитологических, так и биохимических параметров [16]. Отметим, что данных о величине LOAEL либо NOAEL для НЧ PbO при воздействии на лабораторных животных нами обнаружено не было, а в исследованиях *in vitro* величина потенциально недействующей дозы существенно разнится в зависимости от выбранной модели исследования. Miri и соавт. в исследованиях *in vitro* на клеточной линии нейробластомы Neuro2A в МТТ-тесте продемонстрировали токсическое действие НЧ PbO даже в концентрациях ниже 30 мкг/мл [17], но при этом сами авторы назвали его «незначительным». Вместе с тем в исследовании Nazaricou и соавт. на клеточной линии рака толстой кишки HT-29 в МТТ-тесте показано, что НЧ PbO в концентрациях ниже 500 мкг/мл не оказывают вредного действия [18]. В то же время Khalil и соавт. определили концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀) НЧ PbO по отношению к свежевыделенным макрофагам человека, которая составила 57,1 мкг/мл [19].

Свинец известен своим гематотоксическим действием. Изменение концентрации гемоглобина при свинцовой интоксикации связано с его способностью ингибировать синтез гема, что приводит к повышенному разрушению зрелых и уменьшению количества новых эритроцитов, количество которых

Таблица 3. Показатели общего анализа крови крыс через 24 часа после однократной ингаляционной экспозиции к НЧ оксида свинца ($\bar{X} \pm Sx$)**Table 3. Results of the complete blood count performed 24 hours after a single inhalation exposure of the laboratory rats to lead oxide nanoparticles ($\bar{X} \pm Sx$)**

Показатель / Parameter	Группа / Group	
	Контроль / Control	Опыт / Exposure
Общее число лейкоцитов, $10^9/\text{л}$ / White blood cell count, $10^9/\text{L}$	$1,85 \pm 0,34$	$2,70 \pm 0,39$
Число лимфоцитов, $10^9/\text{л}$ / Lymphocyte count, $10^9/\text{L}$	$1,33 \pm 0,36$	$1,63 \pm 0,23$
Относительное содержание лимфоцитов / Relative lymphocyte count, %	$56,40 \pm 12,95$	$62,86 \pm 5,01$
Число клеток крови среднего размера, $10^9/\text{л}$ / MID cell count, $10^9/\text{L}$	$0,13 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,04^*$
Относительное содержание числа клеток крови среднего размера / Relative MID cell count, %	$4,59 \pm 1,15$	$8,55 \pm 0,74^*$
Число гранулоцитов, $10^9/\text{л}$ / Granulocyte count, $10^9/\text{L}$	$0,23 \pm 0,09$	$0,80 \pm 0,21^*$
Относительное содержание гранулоцитов / Relative granulocyte count, %	$14,01 \pm 4,68$	$28,59 \pm 4,46^*$
Число эритроцитов, $10^{12}/\text{л}$ / Red blood cell count, $10^{12}/\text{L}$	$5,64 \pm 0,87$	$6,88 \pm 0,18$
Содержание гемоглобина в крови, г/л / Hemoglobin, g/L	$132,25 \pm 19,31$	$163,50 \pm 2,85$
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л / Mean corpuscular hemoglobin concentration, g/L	$381,38 \pm 55,87$	$430,88 \pm 8,69$
Среднее содержание гемоглобина эритроците, пг / Mean corpuscular hemoglobin, pg	$20,81 \pm 3,06$	$23,86 \pm 0,69$
Средний объем эритроцита, $\mu\text{м}^3$ / Mean corpuscular volume, μm^3	$47,75 \pm 6,84$	$55,33 \pm 0,79$
Относительная ширина распределения эритроцитов по объему / Red cell distribution width – coefficient of variation, %	$10,90 \pm 1,57$	$12,16 \pm 0,21$
Относительная ширина распределения эритроцитов по объему, $\mu\text{м}^3$ / Red cell distribution width – standard deviation, μm^3	$27,81 \pm 4,00$	$31,76 \pm 0,60$
Гематокрит / Hematocrit, %	$15,34 \pm 2,33$	$19,03 \pm 0,44$
Ретикулоциты / Reticulocytes, %	$0,96 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,06^*$
Число тромбоцитов, $10^9/\text{л}$ / Platelet count, $10^9/\text{L}$	$1075,50 \pm 156,22$	$1294,50 \pm 50,82$
Средний объем тромбоцита, $\mu\text{м}^3$ / Mean platelet volume, μm^3	$6,09 \pm 0,88$	$7,04 \pm 0,14$
Относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, $\mu\text{м}^3$ / Platelet distribution width, μm^3	$9,34 \pm 1,39$	$10,48 \pm 0,27$
Отношение общего объема тромбоцитов к плазме крови (тромбоцитрит) / Plateletcrit, %	$0,37 \pm 0,06$	$0,46 \pm 0,02$
Содержание крупных тромбоцитов в крови / Platelet-large cell ratio, %	$8,59 \pm 2,18$	$10,59 \pm 1,98$

Примечание: * – статистически значимое отличие от контрольной группы (t -критерий Стьюдента при $p \leq 0,05$).

Note: * statistically different from the control group ($p \leq 0.05$, Student's t -test).

в крови уменьшается вместе с общей концентрацией гемоглобина [20]. Вопреки ожиданиям, ни в цельной крови, ни в эритроцитах содержание гемоглобина не снизилось (табл. 3). Вероятно, для видимых изменений этих показателей должно пройти больше времени, чем в нашем исследовании.

Одним из механизмов интоксикации соединениями свинца является развитие окислительного стресса [21]. Свинец, связываясь с белками плазмы крови и тканей, способен инициировать процессы их перекисного окисления, что приводит к накоплению продуктов перекисного окисления и служит пусковым механизмом модификации клеточных мембран в сторону неконтролируемого изменения их проницаемости. Состояние эритроцитов является интегральным показателем мембран организма, их количество статистически значимо не изменилось (табл. 3). Вместе с тем относительная ширина распределения эритроцитов по объему имела тенденцию к увеличению. Известно, что увеличение показателя ширины распределения эритроцитов может косвенно указывать на укорочение жизненного цикла и ускоренную гибель этих клеток через изменение свойств мембранных липидов и белков [22].

Наряду с этим было отмечено компенсаторное усиление эритропоэза, которое проявилось в виде значительного увеличения доли ретикулоцитов, еще одного из наиболее чувствительных эффектов свинцовой интоксикации [16].

По некоторым показателям белой крови выявлено заметное, хотя и статистически незначимое увеличение: общее число лейкоцитов (в 1,41 раза, $p < 0,05$), число лимфоцитов и относительное их содержание (в 1,11 и 0,98 раза соответственно, $p < 0,05$) (табл. 3). Эти сдвиги заслуживают внимания еще и потому, что они достаточно типичны для экспериментальных свинцовых интоксикаций: так, Farkhondeh и соавт. продемонстрировали аналогичные изменения, заключающиеся в значительном увеличении общего и относительного количества лейкоцитов в экспериментальных группах [23].

Тенденция к увеличению лейкоцитов и лимфоцитов является признаком активизации клеточного иммунитета в крови в ответ на однократное ингаляционное воздействие наночастиц и повреждение, вызванное ими, как и увеличение количества гранулоцитов и их объема. Возросло число клеток среднего размера, что может указывать на разрушение наиболее крупных, а значит, зрелых клеток крови после однократного ингаляционного воздействия наночастиц оксида свинца.

Заключение. При однократном ингаляционном поступлении аэрозоля наночастиц оксида свинца размером $18,2 \pm 4,2$ нм в концентрации $0,215$ мг/м³ в течение 4 часов показано его общетоксическое и цитотоксическое действие на крыс. Оно проявилось в изменении гематологических показателей и клеточной реакции глубоких отделов дыхательных путей.

В крови отмечено компенсаторное усиление эритропоэза, которое проявилось в виде значительного увеличения доли ретикулоцитов, а также увеличение абсолютного и относительного числа клеток крови среднего размера и гранулоцитов, что, в свою очередь, свидетельствует о развитии лейкоцитарной реакции в ответ на изменения, индуцированные поступлением наночастиц в организм.

В жидкости бронхоальвеолярного лаважа наблюдалась выраженная клеточная реакция глубоких дыхательных путей, сопровождающаяся увеличением как числа нейтрофильных лейкоцитов, так и соотношения числа нейтрофильных лейкоцитов к альвеолярным макрофагам, что является показателем цитотоксического действия наночастиц оксида свинца.

Результаты проведенного исследования позволяют утверждать, что даже однократное воздействие наночастиц оксида свинца вызывает изменения в функциональном состоянии организма и беспокойность с точки зрения развития патологии, обусловленной экспозицией к наночастицам свинца. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейших исследований, нацеленных на определение недействующей концентрации для наночастиц оксида свинца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Kumar A, Kumar A, Cabral-Pinto MMS, *et al.* Lead toxicity: Health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(7):2179. doi: 10.3390/ijerph17072179
- Boyes WK, van Thriel C. Neurotoxicology of nanomaterials. *Chem Res Toxicol*. 2020;33(5):1121-1144. doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00050
- Childebayeva A, Goodrich JM, Chesterman N, *et al.* Blood lead levels in Peruvian adults are associated with proximity to mining and DNA methylation. *Environ Int*. 2021;155:106587. doi: 10.1016/j.envint.2021.106587
- El-Fakharany YM, Mohamed EM, Etewa RL, Abdel Hamid OI. Selenium nanoparticles alleviate lead acetate-induced toxicological and morphological changes in rat testes through modulation of calmodulin-related genes expression. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36(5):e23017. doi: 10.1002/jbt.23017
- Sallsten G, Ellingsen DG, Berlinger B, Weinbruch S, Barregard L. Variability of lead in urine and blood in healthy individuals. *Environ Res*. 2022;212(Pt C):113412. doi: 10.1016/j.envres.2022.113412
- Lebedová J, Nováková Z, Večeřa Z, *et al.* Impact of acute and subchronic inhalation exposure to PbO nanoparticles on mice. *Nanotoxicology*. 2018;12(4):290-304. doi: 10.1080/17435390.2018.1438679
- Bláhová L, Nováková Z, Večeřa Z, *et al.* The effects of nano-sized PbO on biomarkers of membrane disruption and DNA damage in a sub-chronic inhalation study on mice. *Nanotoxicology*. 2020;14(2):214-231. doi: 10.1080/17435390.2019.1685696
- Dumková J, Smutná T, Vrlíková L, *et al.* Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part Fibre Toxicol*. 2017;14(1):55. doi: 10.1186/s12989-017-0236-y
- Sutunkova MP, Solovyeva SN, Chernyshov IN, *et al.* Manifestation of systemic toxicity in rats after a short-time inhalation of lead oxide nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):690. doi: 10.3390/ijms21030690
- Sutunkova MP, Katsnelson BA, Privalova LI, *et al.* On the contribution of the phagocytosis and the solubilization to the iron oxide nanoparticles retention in and elimination from lungs under long-term inhalation exposure. *Toxicology*. 2016;363-364:19-28. doi: 10.1016/j.tox.2016.07.006
- Kodavanti UP. Respiratory toxicity biomarkers. In: Gupta RC, ed. *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press; 2014:217-239. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00012-9
- Yang W, Wang L, Mettenbrink EM, DeAngelis PL, Wilhelm S. Nanoparticle toxicology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2021;61:269-289. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338
- Faqi AA, ed. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. 2nd ed. Cambridge (Massachusetts): Academic Press; 2017. doi: 10.1016/C2015-0-00147-2
- Puisney C, Baeza-Squiban A, Boland S. Mechanisms of uptake and translocation of nanomaterials in the lung. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1048:21-36. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8_2
- Sutunkova MP, Klinova SV, Ryabova YV, *et al.* Comparative evaluation of the cytotoxic effects of metal oxide and metalloid oxide nanoparticles: An experimental study. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9):8383. doi: 10.3390/ijms24098383
- Sutunkova MP, Solovyeva SN, Chernyshov IN, *et al.* Manifestation of systemic toxicity in rats after a short-time inhalation of lead oxide nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):690. doi: 10.3390/ijms21030690
- Miri A, Sarani M, Hashemzadeh A, Mardani Z, Darroudi M. Biosynthesis and cytotoxic activity of lead oxide nanoparticles. *Green Chem Lett Rev*. 2018;11(4):567-572. doi: 10.1080/17518253.2018.1547926
- Nazaripour E, Mousazadeh F, Moghadam MD, *et al.* Biosynthesis of lead oxide and cerium oxide nanoparticles and their cytotoxic activities against colon cancer cell line. *Inorg Chem Commun*. 2021;131:108800. doi: 10.1016/j.inoche.2021.108800
- Khalil AT, Ovais M, Ullah I, *et al.* Bioinspired synthesis of pure massicot phase lead oxide nanoparticles and assessment of their biocompatibility, cytotoxicity and in-vitro biological properties. *Arab J Chem*. 2020;13(1):916-931. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.08.009
- Kalahasthi R, Barman T. Effect of lead exposure on the status of reticulocyte count indices among workers from lead battery manufacturing plant. *Toxicol Res*. 2016;32(4):281-287. doi: 10.5487/TR.2016.32.4.281
- Saikiran G, Mitra P, Sharma S, Kumar PK, Sharma P. Selenium, oxidative stress and inflammatory markers in handicraft workers occupationally exposed to lead. *Arch Environ Occup Health*. 2022;77(7):561-567. doi: 10.1080/19338244.2021.1968780
- Said AS, Spinella PC, Hartman ME, *et al.* RBC distribution width: Biomarker for red cell dysfunction and critical illness outcome? *Pediatr Crit Care Med*. 2017;18(2):134-142. doi: 10.1097/PCC.0000000000001017
- Farkhondeh T, Boskabady MH, Kohi MK, Sadeghi-Hashjin G, Moïn M. Lead exposure affects inflammatory mediators, total and differential white blood cells in sensitized guinea pigs during and after sensitization. *Drug Chem Toxicol*. 2014;37(3):329-335 doi: 10.3109/01480545.2013.866133

Сведения об авторах:

Сутункова Марина Петровна – д.м.н., директор; e-mail: sutunkova@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>.

✉ **Минигалиева** Ильзира Амировна – д.б.н., заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики; e-mail: ilzira@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>.

Клинова Светлана Владиславовна – к.б.н., научный сотрудник, заведующий лабораторией промышленной токсикологии отдела токсикологии и биопрофилактики; e-mail: klinovasv@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0927-4062>.

Рябова Юлия Владимировна – научный сотрудник, заведующий лабораторией научных основ биологической профилактики отдела токсикологии и биопрофилактики; e-mail: ryabova@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>.

Тажигулова Анастасия Валерьевна – младший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики; e-mail: tazhigulovaav@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9384-8550>.

Шабардина Лада Владимировна – младший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики; e-mail: shabardinalv@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8284-0008>.

Батенева Влада Андреевна – лаборант отдела токсикологии и биопрофилактики; e-mail: bateneva@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4694-0175>.

Шеломенцев Иван Глебович – научный сотрудник отдела молекулярной биологии и электронной микроскопии; e-mail: shelomencev@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8795-8777>.

Привалова Лариса Ивановна – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики; e-mail: privalovali@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования: *Сутункова М.П., Минигалиева И.А.*; проведение эксперимента, сбор и обработка материала: *Клинова С.В., Рябова Ю.В., Тажигулова А.В., Шабардина Л.В., Батенева В.А., Шеломенцев И.Г.*; научное консультирование: *Привалова Л.И.* Все авторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Соблюдение этических стандартов: Исследование было одобрено Этическим комитетом Екатеринбургского медицинского-научного центра профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий, протокол №4 от 12.07.2022.

Ограничение исследования. Настоящее исследование ограничено изучением изменения параметров бронхоальвеолярной лаважной жидкости и крови одного вида животных (лабораторные крысы) после острого ингаляционного воздействия наночастиц оксида свинца в одной дозе.

Финансирование: исследование произведено без спонсорской поддержки.

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

Статья получена: 10.08.23 / Принята к публикации: 10.09.23 / Опубликовано: 29.09.23

Author information:

Marina P. **Sutunkova**, Dr. Sci. (Med.), Director; e-mail: sutunkova@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>.

✉ Ilzira A. **Minigalieva**, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: ilzira@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>.

Svetlana V. **Klinova**, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Head of the Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: klinovasv@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0927-4062>.

Yuliya V. **Ryabova**, Researcher, Head of the Laboratory of Scientific Fundamentals of Biological Prophylaxis, Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: ryabova@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>.

Anastasia V. **Tazhigulova**, Junior Researcher, Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: tazhigulovaav@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9384-8550>.

Lada V. **Shabardina**, Junior Researcher, Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: shabardinalv@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8284-0008>.

Vlada A. **Bateneva**, Laboratory Assistant, Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: bateneva@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4694-0175>.

Ivan G. **Shelomentsev**, Researcher, Department of Molecular Biology and Electron Microscopy; e-mail: shelomencev@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8795-8777>.

Larisa I. **Privalova**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Department of Toxicology and Bioprophylaxis; e-mail: privalovali@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>.

Author contributions: study conception and design: *Sutunkova M.P., Minigalieva I.A.*; animal experiment, data collection and processing, analysis and interpretation of results: *Klinova S.V., Ryabova Yu.V., Tazhigulova A.V., Shabardina L.V., Bateneva V.A., Shelomentsev I.G.*; scientific consulting: *Privalova L.I.* All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with the principles of bioethics: The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers (protocol No. 4 of July 12, 2022).

Study limitations: The research is limited to the study of changes in parameters of bronchoalveolar lavage fluid and blood of one animal species (laboratory rats) following acute inhalation exposure to lead oxide nanoparticles in a single dose.

Funding: This research received no external funding.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Received: August 10, 2023 / Accepted: September 10, 2023 / Published: September 29, 2023