

© Кацнельсон Б.А., Сутункова М.П., Привалова Л.И., Соловьева С.Н., Гурвич В.Б., Бушуева Т.В., Сахаутдинова Р.Р., Валамина И.Е., Макеев О.Г., Зубарев И.В., Минигалиева И.А., Клинова С.В., Шур В.Я., Грибова Ю.В., Царегородцева А.Е., Коротков А.В., Шуман Е.А., Шишкина Е.В., 2018

УДК 615.9

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА НИКЕЛЯ ПРИ ИНГАЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Б.А. Кацнельсон¹, М.П. Сутункова¹, Л.И. Привалова¹, С.Н. Соловьёва¹, В.Б. Гурвич¹, Т.В. Бушуева¹, Р.Р. Сахаутдинова¹, И.Е. Валамина², О.Г. Макеев², И.В. Зубарев³, И.А. Минигалиева¹, С.В. Клинова¹, В.Я. Шур³, Ю.В. Грибова¹, А.Е. Царегородцева², А.В. Коротков², Е.А. Шуман², Е.В. Шишкина³

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, ул. Попова, д. 30, г. Екатеринбург, 620014, Россия

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, ул. Репина, д. 3, г. Екатеринбург, 620028, Россия

³ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина», ул. Мира, д. 19, г. Екатеринбург, 620002, Россия

Приведены основные результаты, полученные в эксперименте, основанном на повторных низко-уровневых ингаляционных экспозициях лабораторных животных (белые крысы, аутбредные) к наночастицам оксида никеля (НЧ NiO) диаметром (23 ± 5) нм по 4 часа в день 5 раз в неделю продолжительностью до 10 месяцев в установке типа «только нос». Показано, что неспецифические реакции организма на действие НЧ NiO включают в себя: разнообразные проявления системной токсичности с особо выраженным влиянием на функцию печени и почек, окислительно-восстановительный баланс, повреждение некоторых участков мозговой ткани, связанное с доказанным транспортом самих наночастиц со слизистой носа по ольфакторному тракту; некоторые цитологические признаки вероятного развития аллергического синдрома; парадоксально низкую выраженность пульмонарной патологии по пневмокониотическому типу, объяснимую малой хронической задержкой наночастиц в легких; генотоксический эффект организменного уровня даже при тех низких уровнях хронической экспозиции, при которых системная токсичность выражена довольно слабо. Наряду с этим НЧ NiO вызывают и относительно специфичную для токсических эффектов никеля фазовую стимуляцию эритропоэза.

Ключевые слова: наночастицы, оксид никеля, цитотоксичность, токсичность.

B.A. Katsnelson, M.P. Sutunkova, L.I. Privalova, S.N. Solovjeva, V.B. Gurvich, T.V. Bushueva, R.R. Sakha-utdinova, I.E. Valamina, O.H. Makeyev, I.V. Zubarev, I.A. Minigalieva, S.V. Klinova, V.Ya. Shur, Yu.V. Gribova, A.E. Tsaregorodtseva, A.V. Korotkov, E.A. Shuman, E.V. Shishkina **TOXIC EFFECTS ASSESSMENT OF NICKEL OXIDE NANOPARTICLES BY INHALATION** **Ekaterinburg Medical Research Center for Prevention and Health Promotion of Industrial Workers of Rospotrebnadzor, 30 Popova Str., Ekaterinburg, 620014, Russia; Ural State Medical University of the Russian Ministry of Health, 3 Repina Str., Ekaterinburg, 620028, Russia; Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 19 Mira Str., Ekaterinburg, 620002, Russia.**

The article presents an experiment obtained principal results based on repeated low-level inhalation exposures of laboratory animals (white rats, outbred) to nickel oxide nanoparticles with a diameter of (23 ± 5) nm, 4 hours a day, 5 times a week for up to 10 months in a «nose only» installation. It was shown that non-specific body reactions to the action of NiO NPs include: diverse manifestations of systemic toxicity with a particularly pronounced influence on liver and kidney function, redox balance, damage to some areas of brain tissue, associated with proven movement of the nanoparticles themselves from the nasal mucosa along the olfactory tract; some cytological signs of probable development for allergic syndrome; paradoxically low severity of pulmonary pathology by pneumoconiotic type explained by a small chronic delay of nanoparticles in the lungs; the genotoxic effect of the organismal level, even at those low levels of chronic exposure, at which systemic toxicity is rather poorly. Along with that, NiO NPs also induce phase-stimulation of erythropoiesis, which is relatively specific for the toxic nickel effects.

Key words: nanoparticles, Nickel oxide, cytotoxicity, toxicity.

Токсикология наночастиц оксида никеля (НЧ NiO) была и остается объектом многих экспериментальных исследований. Однако преобладающее большинство их проводилось *in vitro* на культивируемых клетках [2, 4, 5] или иногда на дафниях [9], тогда как в экспериментах на животных *in vivo* использовались в основном однократные или повторные интратрахеальные инстилляций [4, 6], а иногда и пероральное введение [7]. Мы не нашли исследований, в которых хроническая токсичность этих наночастиц была бы изучена по достаточно большому

числу информативных показателей [13, 14] кроме нашей собственной работы [11].

Однако количественных и даже описательных данных для обоснования достоверной оценки рисков для здоровья, связанных с профессиональным и экологическим воздействием НЧ NiO, все еще недостаточно. Исследования, проведенные в разных лабораториях разными методами на разных экспериментальных моделях с оценкой токсического действия по не часто совпадающим показателям, трудно сопоставимы и обобщаемы. Такая критическая оценка

ситуации наиболее справедлива в отношении изучения хронической токсичности рассматриваемого агента, наиболее важной для профилактической токсикологии.

Материалы и методы. Витающие НЧ, полученные с помощью искрового разряда между стержнями 99,99 % химически чистого никеля в атмосфере азота, окислялись в воздушном потоке и подавались в автоматически управляемую многоразовую ингаляционную установку («башню») типа «только нос» на 60 крыс. Аналогичная «башня» использовалась для параллельно проводимой псевдо-экспозиции контрольных крыс.

Ингаляционную экспозицию к НЧ NiO проводили 5 раз в неделю по 4 часа в день в течение 3, 6 или 10 месяцев в концентрации $(0,23 \pm 0,01)$ мг/м³. Для выбора концентрации предварительно был проведен пилотный эксперимент с 5-кратным воздействием при концентрации $(1,00 \pm 0,12)$ мг/м³. Концентрации определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Химическая идентичность НЧ, отобранных на поликарбонатные фильтры, подтверждена с помощью Рамановской спектроскопии. Средний размер частиц, оцененный путем подсчета частиц разного диаметра при сканирующей электронной микроскопии фильтров, составлял (23 ± 5) нм.

Эксперименты были проведены на аутбредных крысах-самках из собственной колонии при начальной массе тела 150–220 г. в возрасте 3–4 месяцев. Каждая экспонированная или контрольная группа включала не менее 12 особей. Крысы содержались в специальном помещении, отделенном от остальных помещений вивария, и получали чистую бутилированную воду и стандартный сбалансированный корм, хранимый отдельно от общих запасов. Животные содержались в условиях, соответствующих СП 2.2.1.3218–14 [1].

Эксперименты планировались и осуществлялись в соответствии с «International guiding principles for biomedical research involving animals developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences» и с одобрения Комиссии по этике ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (Центр).

После завершения периода экспозиций проводились следующие исследования: взвешивание; оценка суммационно-порогового показателя активности безусловных защитных рефлексов (СПП); регистрация двигательной активности и

исследовательского поведения по числу пересекаемых квадратов и заглядываний в «норки»; сбор мочи на протяжении 24 часов для измерения диуреза, содержания в ней креатинина, копропорфирина, общего белка, мочевой кислоты и мочевины. Затем крыс умерщвляли быстрой перерезкой шейных сосудов, собирали кровь, вскрывали полости для извлечения и взвешивания внутренних органов. Биохимические показатели, определяемые в крови, включали общий белок, альбумин, глобулины, билирубин, церулоплазмин, восстановленный глутатион, малоновый диальдегид (МДА), лактатдегидрогеназу (ЛДГ), щелочную фосфатазу, аланин- и аспартат-аминотрансферазы (АлТ, АсТ), каталазу, гамма-глутаминтрансферазу (ГГТ), креатинин. С помощью автоматического гематологического анализатора MYTHIC-18 определяли гемоглобин, гематокрит, эритроциты, средний объем эритроцитов, ширину распределения эритроцитов, тромбоциты, лейкоциты, лейкоцитарную формулу. Ретикулоциты подсчитывали рутинным способом. Проводилось цитохимическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови, основанное на восстановлении *para*-нитротетразолия фиолетового до формазана и подсчете гранул последнего при оптической микроскопии с иммерсией.

Статистическая значимость межгрупповых различий средних значений всех величин оценивалась с помощью критерия *t* Стьюдента с внесением поправки Бонферрони для множественных сравнений.

Результаты исследования. Пятикратная экспозиция НЧ NiO в концентрации 1 мг/м³ приводила к изменению некоторых показателей состояния организма экспериментальных животных. В табл. 1 приведены лишь те показатели, по которым экспонированная группа отличалась от контрольной статистически значимо.

Пропорция ретикулоцитов после окончания экспозиции через 24 часа статистически значительно увеличилась (табл. 1), а через неделю после воздействия значительно снизилось, но оставалось достоверно выше, чем в контрольной группе ($25,86 \pm 3,88$ % и $15,22 \pm 1,37$ % соответственно).

К моменту выведения животных из эксперимента было зафиксировано снижение потребления корма у опытных животных на 30 % по сравнению с контрольными.

Таблица 1. Показатели состояния организма крыс, подвергавшихся 5-кратной ингаляционной экспозиции наночастицами NiO в концентрации 1 мг/м³ ($X \pm S_x$)

Table 1. Rats vital signs exposed to 5 times inhalation exposure with NiO nanoparticles at 1 mg/m³ concentration ($X \pm S_x$)

Показатели	Через 24 часа после завершающей экспозиции	
	Контроль	НЧ NiO
Масса печени, г на 100 г массы тела	$3,12 \pm 0,05$	$3,41 \pm 0,07^*$
Лейкоциты, 10^6 /мл	$8,68 \pm 0,62$	$10,94 \pm 0,64^*$
Эритроциты, 10^{12} /мл	$6,92 \pm 0,13$	$7,33 \pm 0,14^*$
Гемоглобин, г/л	$146,00 \pm 2,30$	$154,42 \pm 2,09^*$
Гематокрит, %	$41,32 \pm 0,62$	$43,32 \pm 0,62^*$
Ширина распределения эритроцитов, %	$14,24 \pm 0,18$	$15,12 \pm 0,19^*$
Содержание ретикулоцитов в эритроцитах периферической крови, %	$19,01 \pm 1,58$	$46,43 \pm 3,14^*$
МДА в сыворотке крови, мкмоль/л	$5,72 \pm 0,37$	$8,140 \pm 1,09^*$
Мочевина в сыворотке крови, ммоль/л	$5,85 \pm 0,40$	$4,80 \pm 0,16^*$
ЛДГ, Е/л	$1665,13 \pm 273,57$	$2663,00 \pm 360,17^*$
Активность СДГ, количество гранул формазана в 50 лимфоцитах	$800,25 \pm 36,65$	$553,88 \pm 10,10^*$

Примечание. «*» статистически значимое отличие от контрольной группы при ($p < 0,05$) по *t*-критерию Стьюдента).

Note. «*» statistically significant difference from the control group ($p < 0.05$ by Student's *t*-test).

Учитывая выраженность показателей хроническую экспозицию решено было проводить при концентрации, сниженной в 4–5 раз.

При анализе общетоксического действия через 3, 6 и 10 месяцев ингаляции НЧ NiO в концентрации 0,23 мг/м³ некоторые показатели состояния организма, которые представлены в табл. 2, отличались статистически значимо от соответствующего показателя контрольной группы.

Как в кратковременном пилотном эксперименте, так и к 3-месячному сроку основного эксперимента наблюдаются повышенное содержание гемоглобина, повышенное число эритроцитов с увеличенной пропорцией ретикулоцитов, повышенный гематокрит. Однако в последующие сроки о возможной реакции костного мозга говорило только статистически значимое повышение пропорции ретикулоцитов.

Известно, что никель существенно ускоряет старение эритроцитов через изменение свойств мембранных липидов и белков [16]. Влияние на содержание лейкоцитов в периферической крови (лейкоцитоз) было найдено только в пилотном эксперименте. Во все три срока хронического эксперимента количество лейкоцитов не было изменено.

Интересно, что фазовость реакции на хроническое ингаляционное воздействие NiO, возможно свидетельствующая об адаптации организма к нему, кроме реакции со стороны красной крови обнаружена нами и по такому важному токсическому эффекту как подавление энергетического метаболизма. Действительно, типичное снижение цитохимического показателя активности сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови [11], было выраженным и статистически значимым только к 3-месячному сроку, но вообще отсутствовало в последующем.

Интенсивность перекисного окисления липидов, оцениваемая по концентрации малонового диальдегида (MDA) в сыворотке крови, напро-

тив, была только в последний срок (10 мес.) значимо повышена, в то время как в первый (3 мес.) – значимо снижена, а в промежуточный срок (6 мес.) фактически не изменена. Значимых изменений содержания восстановленного глутатиона и суммарных сульфгидрильных групп в крови не наблюдалось вообще.

Ни по одному показателю, характеризующему усиление тормозных процессов в ц.н.с. (удлинение показателя суммации подпороговых импульсов, снижение поведенческих показателей исследовательской и общей двигательной активности), не было статистически значимого отличия от контрольной величины, а их общий тренд имел скорее противоположную направленность – особенно в конце экспозиционного периода.

Это обстоятельство особо интересно потому, что при ингаляционной экспозиции одной из мишеней действия наночастиц, первично отлагающихся в носовых ходах, является головной мозг, в который они перемещаются по волокнам обонятельного нерва [8, 10]. И действительно, при электронной микроскопии препаратов обонятельных луковиц головного мозга крыс данного эксперимента мы находим и скопления наночастиц, и ультраструктурные повреждения.

Отсутствует значимое изменение относительной массы селезенки и печени, а также ряда показателей функции печени (содержание белка и отдельных белковых фракций в сыворотке крови и активность аминотрансфераз, щелочной фосфатазы) во все три срока хронического эксперимента. Однако токсическое действие НЧ NiO на печень отрицать нельзя: найдено статистически значимое увеличение содержания билирубина в сыворотке крови (хотя его повышение может быть связано и с усиленным разрушением эритроцитов), а при кратковременном воздействии (табл. 1) было найдено увеличение массового показателя печени, содержания мочевины в сыворотке крови, уровня ЛДГ.

Таблица 2. Показатели состояния организма крыс, подвергавшихся ингаляционной загрузке наночастицами NiO в концентрации (0,23 ± 0,01) мг/м³ (X ± S_x)

Table 2. Rats vital signs exposed to inhalation priming with NiO nanoparticles at (0.23 ± 0.01) mg/m³ concentration (X ± S_x)

Показатели	Время экспозиции					
	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
Прирост массы тела, %	15,2 ± 3,9	14,4 ± 2,3	13,7 ± 2,3	17,4 ± 2,7	25,1 ± 2,8	17,2 ± 1,7*
Масса легких, г на 100 г массы тела	0,87 ± 0,09	1,23 ± 0,10*	0,69 ± 0,06	0,93 ± 0,08*	1,16 ± 0,09	1,61 ± 0,12*
Эритроциты, 10 ¹² /мл	6,37 ± 0,22	7,08 ± 0,17*	7,23 ± 0,11	6,94 ± 0,12	6,92 ± 0,24	6,75 ± 0,08
Гемоглобин, г/л	141,3 ± 3,5	158,2 ± 2,8*	152,8 ± 1,8	151,1 ± 2,1	151,5 ± 3,8	154,7 ± 2,2
Гематокрит, %	37,18 ± 1,16	41,56 ± 0,86*	43,28 ± 0,58	43,18 ± 0,66	39,94 ± 1,22	39,22 ± 0,84
Лейкоциты, 10 ³ /мл	6,93 ± 0,61	6,00 ± 0,45	5,79 ± 0,42	5,68 ± 0,33	5,62 ± 0,27	6,36 ± 0,38*
Содержание ретикулоцитов в периферической крови, %	11,92 ± 1,28	16,75 ± 1,39*	13,73 ± 1,28	20,39 ± 1,56*	12,55 ± 0,86	15,89 ± 0,62*
МДА в сыворотке крови	5,17 ± 0,39	3,97 ± 0,31*	5,07 ± 0,38	5,74 ± 0,61	5,56 ± 0,72	7,84 ± 0,79*
СДГ, число гранул формазана в 50 лимфоцитах	747,3 ± 9,2	553,3 ± 5,8*	621,6 ± 10,7	640,7 ± 10,8	619,3 ± 11,1	619,4 ± 6,8
Билирубин общий, мкмоль/л	1,09 ± 0,17	1,56 ± 0,14*	0,96 ± 0,14	1,30 ± 0,09*	1,14 ± 0,10	1,66 ± 0,23*
Креатинин в сыворотке крови, мкмоль/л	56,43 ± 5,87	48,14 ± 3,26	46,42 ± 2,02	52,61 ± 2,19*	57,95 ± 3,57	57,54 ± 2,99
Общий белок в моче, мг/л	144,1 ± 12,9	137,7 ± 7,4	69,8 ± 8,25	108,5 ± 15,94*	96,4 ± 32,85	181,8 ± 122,39
Мочевина в моче, ммоль/л	95,2 ± 7,8	106,6 ± 14,3	240,3 ± 25,2	235,2 ± 34,7	175,6 ± 9,3	111,2 ± 8,1*
Коэффициент фрагментации геномной ДНК в ядрах содержащих клетках крови	0,4229 ± 0,0008	0,4480 ± 0,0017*	0,4247 ± 0,0006	0,5332 ± 0,0031*	0,4244 ± 0,0005	0,5447 ± 0,0036*

Примечание: «*» статистически значимое отличие от контрольной группы при (p < 0,05) по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферони.

Note: «*» statistically significant difference from the control group (p < 0.05) by Student's t-test with Bonferroni correction.

Протеинурия, статистически значимая только к 6-месячному сроку, может отражать нарушение функции почек, хотя изменений других показателей, отражающих нефротоксическое действие, отмечено не было (диурез, плотность мочи, эндогенный клиренс креатинина).

Особого упоминания в случае ингаляционного воздействия требует увеличение как сырой, так и сухой массы легких, типичное для любого экспериментального пневмокониоза, но в данном случае статистически значимое только к 10-месячному сроку. К этому сроку была наиболее высокой и задержка никеля в легочной ткани по данным как АЭС ($3,69 \pm 0,35$) против ($0,96 \pm 0,30$) мкг/кг в sham-exposed группе; $P < 0,05$), так и ЭПР-спектроскопии (соответственно, ($0,39 \pm 0,04$) и ($0,09 \pm 0,03$) мкг/кг; $P < 0,05$). Вместе с тем, при электронной микроскопии легких немалое число наночастиц или их нано-размерных агрегатов во все сроки исследования видны не только как интернализированные фагоцитирующими клетками, но и свободно лежащими внутри альвеол, что, по-видимому, является результатом их недавнего отложения из вдыхаемого воздуха.

В то же время при оптико-микроскопическом гистологическом исследовании легочной ткани даже к концу эксперимента не обнаружены ни типичные для экспериментальных пневмокониозов клеточно-фиброзные узелки, ни утолщение или диффузный фиброз межальвеолярных перегородок, которые скорее истончены или даже разрушены (эмфизема), а ретикулиновая строма не грубее, чем у контрольных крыс (рис. 1).

Как видно из табл. 3, в тканевых отпечатках легких наблюдается 10-кратное увеличение доли дегенеративно измененных макрофагов во все три срока исследования. Не наблюдается никаких сдвигов во вкладе доли эозинофилов.

В отпечатках трахеобронхиальных лимфоузлов обращает на себя внимание, прежде всего значимое снижение доли лимфоцитов за счет увеличения доли других клеточных элементов, но в основном – клеток воспаления.

В печени под влиянием НЧ NiO происходит статистически значимое увеличение доли дегенеративно-измененных гепатоцитов с одновременным значимым снижением доли не измененных гепатоцитов во все три срока исследования. Наблюдается увеличение доли клеток Купфера – в первых двух сроках статистически значимо. Возможно, этот сдвиг связан с активацией данной популяции резидентных макро-

фагов под влиянием фагоцитируемых ими наночастиц или является косвенным признаком усиленного апоптоза гепатоцитов (учитывая роль клеток Купфера в утилизации апоптозных телец [3]).

В отпечатках почек отмечено повреждение клеток как проксимальных, так и дистальных извитых канальцев, характеризуемое в значимом снижении доли не измененных и увеличении доли дегенеративно измененных клеток в соответствующих отделах нефрона.

Интересно, что по некоторым важным показателям этого рода (например, по проценту эозинофилов в отпечатках печени и селезенки) мы вновь видим ослабление вызванных экспозицией сдвигов по мере удлинения экспозиционного периода.

При анализе тканевых отпечатков этих же органов после 5-кратного ингаляционного воздействия НЧ NiO в концентрации 1 мг/м^3 наблюдаются сдвиги той же направленности, однако увеличение доли эозинофилов и нейтрофилов наблюдалось в каждом исследуемом органе, что свидетельствует о развитии выраженной воспалительной реакции гиперергического типа. Отметим, что после воздействия НЧ NiO в концентрации $0,2 \text{ мг/м}^3$ увеличение долей нейтрофилов и эозинофилов наблюдалось только в печени и селезенке.

Содержание специфического IgE в сыворотке крови не отличалось статистически значимо от контроля, хотя наблюдалась активация реакции специфического лизиса лейкоцитов в последний срок хронического эксперимента после ингаляции НЧ NiO ($15,84 \pm 2,28$) по сравнению с контролем ($7,56 \pm 0,74$), различие статистически значимо при ($p < 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

То, что никель является аллергеном и может вызывать эозинофилию, хорошо известно. Появляются исследования аллергенного действия и наночастиц Ni, так, Seonghan Lee et al. при цитологическом и биохимическом анализе БАЛЖ и сыворотки крови показали, что интратрахеальная инстилляцией НЧ NiO вызывала нейтрофилию через 1 и 2 дня после инстилляций, в то время как смешанный тип нейтрофильного и эозинофильного воспаления наблюдался через 3 и 4 дня после введения, что соответствовало реакции от воздействия NiCl_2 через сутки. Приток эозинофилов НЧ NiO не был связан ни с уровнями общего IgE, ни с анафилотоксинами [12].

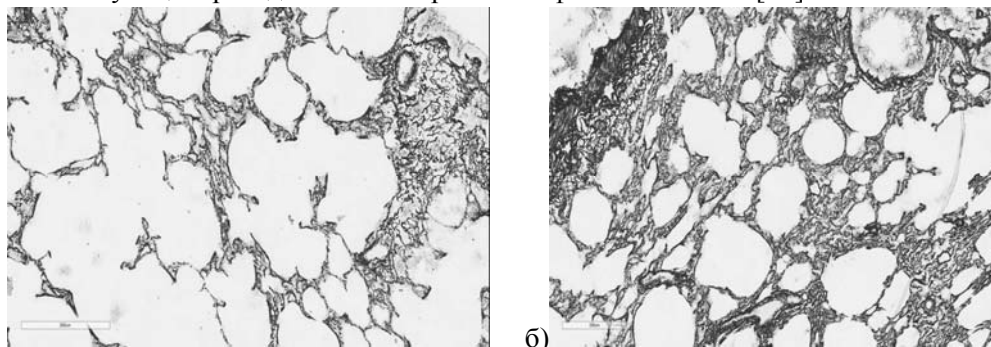


Рис. 1. Легкие крысы (а) после 10-месячной ингаляционной NiO экспозиции; (б) в контрольной группе того же срока. Импрегнация серебром по Гомори, увеличение $\times 400$. Описание в тексте

Fig. 1. Rat lungs (a) after 10-month inhalation exposure to NiO; (b) in the control group of the same exposure period. Gomori's silver impregnation, magnification $\times 400$. See description in the text.

Таблица 3. Некоторые цитологические характеристики различных тканевых мазков-отпечатков крыс через сутки после ингаляционного воздействия наночастиц NiO в концентрации $(0,23 \pm 0,01)$ мг/м³, в процентах от общего количества клеток ($X \pm S_x$)

Table 3. Some cytological characteristics of various tissue rats smears-prints a day after inhalation with NiO nanoparticles at (0.23 ± 0.01) mg/m³ concentration, as a percentage of the total number of cells ($X \pm S_x$)

Органы и клетки	Длительность экспозиции					
	3 месяца		6 месяцев		10 месяцев	
	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO	Контроль	НЧ NiO
Легкие						
Нейтрофилы	20,00 $\pm$ 0,55	14,40 $\pm$ 2,46*	7,86 $\pm$ 0,50	3,14 $\pm$ 0,46*	4,40 $\pm$ 0,51	2,40 $\pm$ 0,24*
Альвеолярные макрофаги	4,60 $\pm$ 0,51	4,00 $\pm$ 0,38	5,43 $\pm$ 0,57	10,29 $\pm$ 1,91*	4,60 $\pm$ 0,51	15,40 $\pm$ 0,75*
Дегенеративно измененные альвеолярные макрофаги	2,80 $\pm$ 1,32	26,60 $\pm$ 3,79*	2,29 $\pm$ 0,46	28,43 $\pm$ 1,84*	3,40 $\pm$ 0,81	34,00 $\pm$ 1,38*
Эозинофилы	4,00 $\pm$ 0,66	4,20 $\pm$ 0,86	2,00 $\pm$ 0,20	4,00 $\pm$ 0,44*	0,80 $\pm$ 0,20	0,40 $\pm$ 0,24
Печень						
Гепатоциты	55,50 $\pm$ 1,57	37,71 $\pm$ 1,48*	80,86 $\pm$ 1,35	58,00 $\pm$ 1,41*	71,33 $\pm$ 1,73	62,00 $\pm$ 1,59*
Дегенеративно измененные гепатоциты	8,75 $\pm$ 0,84	21,86 $\pm$ 0,99*	3,29 $\pm$ 0,42	11,43 $\pm$ 0,87*	5,33 $\pm$ 0,42	8,17 $\pm$ 0,48*
Нейтрофилы	7,20 $\pm$ 0,66	11,57 $\pm$ 0,97*	3,71 $\pm$ 0,68	8,14 $\pm$ 0,51*	5,83 $\pm$ 0,40	11,17 $\pm$ 0,95*
Эозинофилы	3,50 $\pm$ 0,40	7,29 $\pm$ 0,68*	0,71 $\pm$ 0,18	4,29 $\pm$ 0,61*	3,50 $\pm$ 0,67	3,00 $\pm$ 0,37
Купферовские клетки	3,00 $\pm$ 0,68	5,43 $\pm$ 0,48*	1,29 $\pm$ 0,18	4,14 $\pm$ 0,91*	3,17 $\pm$ 0,60	4,67 $\pm$ 0,49
Почки						
Клетки проксимальных канальцев	67,75 $\pm$ 0,85	51,00 $\pm$ 1,60*	67,86 $\pm$ 2,01	61,14 $\pm$ 1,44*	71,50 $\pm$ 0,85	57,71 $\pm$ 1,38*
Дегенеративные клетки проксимальных канальцев	11,33 $\pm$ 0,58	22,71 $\pm$ 1,64*	5,29 $\pm$ 0,29	12,00 $\pm$ 0,82*	5,50 $\pm$ 0,45	13,00 $\pm$ 0,76*
Клетки дистальных канальцев	7,67 $\pm$ 0,85	10,00 $\pm$ 0,72	10,00 $\pm$ 0,93	5,29 $\pm$ 0,61*	8,83 $\pm$ 0,76	6,43 $\pm$ 0,48*
Дегенеративные клетки дистальных канальцев	5,67 $\pm$ 0,65	8,43 $\pm$ 0,65 *	4,71 $\pm$ 0,42	9,43 $\pm$ 0,65*	4,33 $\pm$ 0,22	9,43 $\pm$ 0,53*
Лимфоузлы						
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	91,80 $\pm$ 1,02	78,29 $\pm$ 3,48*	93,29 $\pm$ 0,68	84,14 $\pm$ 1,06*	91,33 $\pm$ 1,13	78,86 $\pm$ 1,93*
Лимфобласты	1,20 $\pm$ 0,37	3,29 $\pm$ 0,36*	1,14 $\pm$ 0,14	1,43 $\pm$ 0,20	1,00 $\pm$ 0,00	1,14 $\pm$ 0,14
Ретикулярные клетки	0,80 $\pm$ 0,20	0,57 $\pm$ 0,20	0,43 $\pm$ 0,20	0,43 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Плазмоциты	2,80 $\pm$ 0,37	7,57 $\pm$ 2,17	2,29 $\pm$ 0,52	9,57 $\pm$ 0,57*	3,33 $\pm$ 1,13	9,14 $\pm$ 1,70*
Макрофаги	1,20 $\pm$ 0,20	3,86 $\pm$ 0,63*	1,14 $\pm$ 0,14	1,86 $\pm$ 0,26*	2,00 $\pm$ 0,41	2,71 $\pm$ 0,57
Нейтрофилы	1,40 $\pm$ 0,24	0,71 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 0,22	1,43 $\pm$ 0,37	1,17 $\pm$ 0,18	5,43 $\pm$ 0,69*
Эозинофилы	0,60 $\pm$ 0,40	5,71 $\pm$ 1,43*	0,71 $\pm$ 0,18	1,14 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,18	2,71 $\pm$ 0,42*
Селезенка						
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	85,60 $\pm$ 2,29	72,57 $\pm$ 1,73*	90,00 $\pm$ 0,69	82,43 $\pm$ 1,49*	90,50 $\pm$ 0,29	82,43 $\pm$ 1,49*
Лимфобласты	0,80 $\pm$ 0,20	1,29 $\pm$ 0,29	1,29 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,14
Плазмоциты	1,40 $\pm$ 0,24	3,00 $\pm$ 0,53*	2,57 $\pm$ 0,72	3,57 $\pm$ 0,95	2,33 $\pm$ 0,85	3,57 $\pm$ 0,95
Макрофаги	2,40 $\pm$ 0,24	3,14 $\pm$ 0,34	1,43 $\pm$ 0,30	2,14 $\pm$ 0,40	1,17 $\pm$ 0,18	2,14 $\pm$ 0,40
Нейтрофилы	2,40 $\pm$ 0,51	4,43 $\pm$ 0,37*	2,57 $\pm$ 0,48	5,71 $\pm$ 0,47*	2,67 $\pm$ 0,50	5,71 $\pm$ 0,47*
Эозинофилы	4,60 $\pm$ 0,68	13,71 $\pm$ 0,97*	2,57 $\pm$ 0,43	4,71 $\pm$ 0,52*	2,67 $\pm$ 0,53	4,71 $\pm$ 0,52*

Примечание: «*» статистически значимое отличие от контрольной группы при ($p < 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

Note: «*» statistically significant difference from the control group ($p < 0.05$) by Student's t-test.

Следует отметить острую и общепризнанную, но все еще неудовлетворительно решенную проблему «наночастиц и аллергии» [15]. Возможно, НЧ металлов и их оксидов оказывают особую способность вызывать токсическое воспаление гиперергического типа, однако для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные специально поставленные эксперименты.

Важнейшим из обнаруженных нами эффектов токсического воздействия НЧ NiO следует считать статистически значимое во все 3 срока ингаляционной экспозиции увеличение (по сравнению с контрольными показателями) коэффициента фрагментации геномной ДНК (Кфр) в циркулирующих ядродержащих клет-

ках крови (табл. 2). Особо отметим, что если в контрольной группе данного эксперимента значение Кфр оставалось фактически постоянным на протяжении всего периода наблюдения, то в экспонированной виден тренд его увеличения с нарастанием длительности ингаляционной экспозиции (при статистически значимом различии между сроками). Таким образом, по генотоксическому эффекту никакой тенденции к адаптации организма к действию НЧ NiO не отмечено, а напротив имеет место постепенное нарастание этого эффекта.

Выводы:

1. Ингаляционное воздействие NiO вызывает разнообразные проявления системной ток-

сичности, повреждение некоторых участков мозговой ткани, некоторые цитологические признаки вероятного развития аллергического синдрома, парадоксально низкую выраженность пульмонарной патологии по пневмоко-ниотическому типу, проявление генотоксично-сти; изменения показателей клеток красной крови, свидетельствующие о фазовой стимуля-ции эритропоэза.

2. С практических же позиций профилакти-ческой токсикологии и оценки рисков для здо-ровья, обусловленных воздействием наночастиц NiO, принципиально важно то, что генотоксич-ность *in vivo* была показана при таком низком уровне экспозиции, при котором общетокси-ческое действие еще мало выражено. По-види-мому, для наночастиц NiO не столько общая токсичность, сколько генотоксичность (и тем самым вполне возможная канцерогенность) должна рас-сматриваться как лимитирующий риск.

ЛИТЕРАТУРА

(п. 2–16 см. References)

1. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): СП 2.2.1.3218–14. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. 15 с.

REFERENCES

1. Sanitarно-epidemiologicheskie trebovaniya k ustroystvu, oborudovaniyu i soderzhaniiyu eksperimental'no-biologi-cheskikh klinik (vivariyev): SP 2.2.1.3218–14 [Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivaria): SR 2.2.1.3218–14.]. Moscow, M.: Federalnyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora. 2015. 15 p. (In Russ.)
2. Ada K., Turk M., Oguztuzun S., Kilic M., Demirel M., Tandogan N. et al. Cytotoxicity and apoptotic effects of nickel oxide nanoparticles in cultured HeLa cells. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2010; 48(4):524–529.
3. Canbay A., Feldstein A.E., Higuchi H., Werneburg N., Grambihler A., Bronk S.F. et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003; 38: 1188–1198.
4. Cao Z., Fang Y., Lu Y., Qian F., Ma Q., He M. et al. Exposure to nickel oxide nanoparticles induces pulmonary inflammation through NLRP3 inflammasome activation in rats. *Int. J. Nanomedicine*. 2016; 11: 3331–3346.
5. Capasso L., Camatini M., Gualtieri M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 2014; 226(1): 28–34.
6. Chang X.H., Zhu A., Liu F.F., Zou L.Y., Su L., Liu S.K. et al. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary

fibrosis via TGF-1 activation in rats. *Human and Experimental Toxicology*. 2017; 36(8): 802–812.

7. Dumala N., Mangalampalli B., Chinde S., Kumari S., Mahoob M., Rahman M. et al. Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutagenesis*. 2017; 32(4): 417–427.
8. Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J. et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environ. Health Perspect.* 2006; 114(8): 1172–1178.
9. Gong N., Shaoc K., Lia G., Sun Y. Acute and chronic toxicity of nickel oxide nanoparticles to *Daphnia magna*: The influence of algal enrichment. *NanoImpact*. 2016; 34: 104–109.
10. Kao Y.-Y., Cheng T.-J., Yang D.-M., Liu P.-Sh. Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent ell in vitro and in vivo. *J. Molecular Neurosci*. 2012; 48(2): 464–71.
11. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., Gurvich V.B., Shur V.Ya. et al. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity *in vivo*. In: *Bioactivity of Engineered Nanoparticles*. Springer, 2017; Ch. 11: 259–319.
12. Lee S., Hwang S.-H., Jeong J., Han Y., Kim S.-H., Lee D.-K. et al. Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin. *Part Fibre Toxicol.* 2016; 13: 30. DOI: 10.1186/s12989-016-0142-8
13. Ogami A., Morimoto Y., Murakami M., Myojo T., Oyabu T., Tanaka I. Biological effects of nano-nickel in rat lungs after administration by inhalation and by intratracheal instillation. *Journal of Physics*, 2009; 151(1).
14. Oyabu T., Myojo T., Lee B.-W., Okada T., Izumi H., Yoshiura Y. et al. Biopersistence of NiO and TiO₂ Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Inhalation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(12): 2757.
15. Radauer-Preiml I., Andosch A., Hawranek T., Luetz-Meindl U., Wiederstein M., Horejs-Hoeck J. Nanoparticle-allergen interactions mediate human allergic responses: protein corona characterization and cellular responses. *Part Fibre Toxicol.* 2016; 13: 3.
16. Tkeshelashvili L., Tsakadze K., Khulusauri O. Effect of some nickel compounds on erythrocyte characteristics. *Biol. Trace Elem. Res.* 1989; 21 (1): 337–342.

Контактная информация:

Сутункова Марина Петровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией токсикологии среды обитания ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора
e-mail: sutunkova@ymrc.ru

Contact information:

Sutunkova Marina, Candidate of Medical Sciences, senior research associate, head of the laboratory of toxicology of the habitat Ekaterinburg Medical and Scientific Center for Prevention and Health Protection of Industrial Enterprises Workers of Rospotrebnadzor
e-mail: sutunkova@ymrc.ru

