

© Сутункова М.П., Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Соловьева С.Н., Гурвич В.Б., Минигалиева И.А., Клинова С.В., Бушуева Т.В., Шур В.Я., Валамина И.Е., Царегородцева А.Е., Шишкина Е.В., 2018
УДК 615.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА НИКЕЛЯ ДВУХ РАЗМЕРОВ В СУБХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М.П. Сутункова¹, Б.А. Кацнельсон¹, Л.И. Привалова¹, С.Н. Соловьёва¹,
В.Б. Гурвич¹, И.А. Минигалиева¹, С.В. Клинова¹, Т.В. Бушуева¹, В.Я. Шур³,
И.Е. Валамина², А.Е. Царегородцева², 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

Проведена сравнительная оценка токсичности наночастиц оксида никеля (NiO) двух размеров (11 и 25 нм) по ряду показателей состояния организма после повторных внутрибрюшинных инъекций суспензий указанных частиц. Найдено, что при равных массовых дозах наночастицы NiO вызывают разнообразные проявления системной субхронической токсичности с особо выраженным влиянием на функции печени, почек, антиоксидантную систему организма, липидный обмен, белую и красную кровь, окислительно-восстановительный обмен, вызывают повреждение селезенки, некоторые нарушения нервной деятельности, предположительно связанные с возможностью проникновения в мозг никеля из крови. Зависимость между диаметром и токсичностью частиц неоднозначна, что может быть связано с различиями токсикокинетики, которую контролируют как физиологические механизмы, так и прямая пенетрация наночастиц через биологические барьеры и, наконец, неодинаковая растворимость.

Ключевые слова: наночастицы, оксид никеля, размер частиц, резорбтивная токсичность, токсикокинетика, растворимость.

M.P. Sutunkova, B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, S.N. Solovjeva, V.B. Gurvich, I.A. Minigalieva, S.V. Klinova, T.V. Bushueva, V.Ya. Shur, I.E. Valamina, A.E. Tsaregorodtseva, E.V. Shishkina
EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF THE NANOPARTICLES TOXICITY OF NICKEL OXIDE IN TWO SIZES IN THE SUBCHRONIC EXPERIMENT 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.

We conducted a comparative assessment of the nickel oxide nanoparticles toxicity (NiO) of two sizes (11 and 25 nm) according to a number of indicators of the body state after repeated intraperitoneal injections of these particles suspensions. At equal mass doses, NiO nanoparticles have been found to cause various manifestations of systemic subchronic toxicity with a particularly pronounced effect on liver, kidney function, the body's antioxidant system, lipid metabolism, white and red blood, redox metabolism, spleen damage, and some disorders of nervous activity allegedly related to the possibility of nickel penetration into the brain from the blood. The relationship between the diameter and toxicity of particles is ambiguous, which may be due to differences in toxicokinetics, which is controlled by both physiological mechanisms and direct penetration of nanoparticles through biological barriers and, finally, unequal solubility.

Key words: nanoparticles, nickel oxide, particle size, resorptive toxicity, toxicokinetic, solubility.

Теоретические предпосылки к ожиданию резкого повышения токсичности веществ в виде наночастиц (НЧ) освещались многими авторами и подтверждены в экспериментальных исследованиях [3, 9, 17, 18, 21, 23]. В пределах нанометрового диапазона зависимость между диаметром и резорбтивной токсичностью частиц неоднозначна [11, 17].

Чем меньше частица, тем быстрее она растворяется во вторичных депо из-за огромной удельной площади ее поверхности. Токсикологическая значимость растворения не только ожидалась априори, но и демонстрировалась экспериментальными данными [22, 25, 30, 32]. Кроме того, мельчайшие НЧ предположительно цитотоксичнее для любых клеток, включая резидентные макрофаги, и, следовательно, в большей степени приводят к их гибели (с возможным выде-

лением НЧ обратно в кровоток). Баланс между этими противоположно действующими механизмами токсикокинетики зависит от многих переменных, но возможно, что для некоторых более крупных металлических НЧ нагрузка на орган при их воздействии (и, следовательно, неблагоприятное воздействие на этот орган) должна быть больше, чем для меньших НЧ той же химической природы, как действительно было обнаружено в экспериментах с Fe₃O₄-НЧ [17]. Важная токсикокинетическая роль соотношения между био-растворимостью и био-персистенцией различных НЧ признается также и другими авторами, но без конкретного рассмотрения этой проблемы [32].

Несмотря на увеличивающееся число исследований по оценке биологической агрессивности НЧ, вопрос о механизмах их токсического действия не может считаться решенным, и

требует как расширения базы экспериментальных данных, так и дополнительного теоретического их осмысления.

Для дальнейших исследований по экспериментальной оценке токсичности нанометаллов нами был выбран оксид никеля (NiO). Загрязнение им воздуха рабочей зоны в том или ином количественном соотношении характерно как при металлургическом производстве никеля и легированных сталей, так и в использовании последних при электросварке и некоторых других процессах.

Токсичность НЧ NiO изучена экспериментально в ряде исследований, в основном, на клеточных культурах и мелких водных организмах [4, 8, 14, 19, 22, 28]. Имеются лишь единичные исследования *in vivo* при субхроническом и хроническом воздействии этих наночастиц [10, 16, 26, 27, 33].

Поэтому целью исследования было изучить токсическое действие наночастиц оксида никеля двух размеров в субхроническом эксперименте *in vivo*.

Цель исследования – изучить токсическое действие наночастиц оксида никеля двух размеров в субхроническом эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы. Все эксперименты были проведены на аутбредных белых крысах из собственной колонии при начальной массе тела 150–220 г в возрасте 3–4 месяцев. Каждая экспериментальная или контрольная группа включала не менее 12 особей. Крысы содержались в специальном помещении, отделенном от остальных помещений вивария, получали чистую бутилированную воду и стандартный сбалансированный корм, хранимый отдельно от общих запасов. Животные содержались в условиях, соответствующих нормативному документу [6].

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).

Специально для эксперимента приготовлены стабильные суспензии металлических НЧ NiO двух размеров – (11 ± 3) и (25 ± 5) нм, полученных лазерной абляцией тонких листовых мишеней из соответствующего металла 99,99%-й чистоты под слоем стерильной деионизированной воды. Распределение НЧ по размерам проводилось их прямым измерением с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 1) и методом динамического рассеивания света. Стабильность суспензий характеризовалась величиной дзета-потенциала, измеренного

с помощью анализатора *Zetasizer Nano ZS* (Malvern). Необходимая концентрация, обеспечивающая стабильность суспензий, составила 0,2 мг/мл.

Суспензии каждого размера НЧ NiO вводили внутривенно по 3 раза в неделю в течение 6 недель. Разовая доза составляла 4,0 мг/кг. Контрольной группе вводили воду без частиц.

Органо-системные токсические эффекты воздействия сравниваемых частиц оценивались после завершения экспозиционного периода по большому числу функциональных и биохимических показателей.

Содержание в печени и селезенке вводимого в организм металла определяли с помощью атомной эмиссионной спектроскопии.

Кроме того, задержка НЧ в печени и селезенке визуализировалась при просвечивающей электронной микроскопии ультратонких срезов с использованием ультрамикротомы (*Power Tome*, «RMC») и микроскопа *AURIGA* («Carl Zeiss; MT») в STEM-режиме в диапазоне увеличения от $\times 1200$ до $\times 200000$.

Для гистологического исследования использовались тонкие срезы фиксированных органов, окрашенных гематоксилин-эозином. Окулярная планиметрическая сетка Автандилова использовалась для морфометрии изменений в печени и селезенке.

Результаты исследования. Как видно из табл. 1, совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что введение НЧ NiO как 11-, так и 25-нанометровых вызывает развитие интоксикации, об умеренности которой говорит такой показатель организменного уровня, как отсутствие значимого снижения прибавки массы тела за период токсической экспозиции.

При рассмотрении показателей органо-системного уровня учитывалась одинаковая в обеих экспериментальных группах направленность ряда выявленных эффектов, независимо от их выраженности и статистической значимости. Например, гепатотоксичность никель-оксидных НЧ отражает дважды отмеченное повышение относительной массы печени, значимое снижение содержания общего белка, альбуминов и альбумин-глобулинового индекса в сыворотке крови. Об угнетении энзимо-образовательной функции печени говорит то, что уровни обеих аминотрансфераз в сыворотке крови были не повышены, а снижены (АЛТ – статистически значимое снижение в обоих случаях), снижен уровень мочевой кислоты в сыворотке крови (при действии больших НЧ снижение статистически значимое). Снижение активности щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы наблюдалось только при действии НЧ 25 нм.

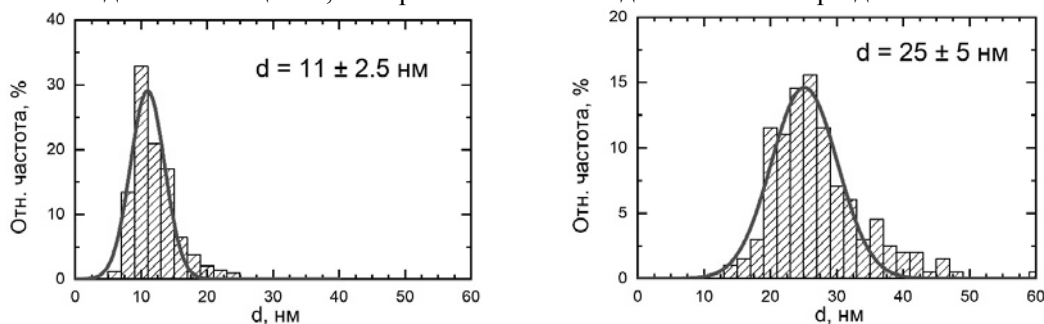


Рис. 1. Распределение наночастиц NiO по размерам по СЭМ-изображениям

Fig. 1. NiO nanoparticle size distribution by SEM-images

Таблица 1. Некоторые показатели организма крыс после внутрибрюшинного введения наночастиц NiO ($X \pm s.e.$)

Table 1. Some indicators of rats vital after intraperitoneal administration of NiO nanoparticles ($X \pm s.e.$)

Показатели	Значения показателей		
	контрольная группа	экспонированная группа	
		NiO 11 нм	NiO 25 нм
Масса до затравки, г	202,31 $\pm$ 5,95	211,15 $\pm$ 2,20	213,85 $\pm$ 3,11
Прирост массы, %	18,55 $\pm$ 3,79	15,14 $\pm$ 1,76	13,64 $\pm$ 2,52
Масса легких, на 100 г м.т.	0,57 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,03
Масса печени, на 100 г м.т.	3,92 $\pm$ 0,25	4,15 $\pm$ 0,16	4,23 $\pm$ 0,18
Масса почек, на 100 г м.т.	0,60 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,02
Масса селезенки, на 100 г м.т.	0,21 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,01 *
Масса мозга, на 100 г м.т.	0,81 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,02*	0,82 $\pm$ 0,02•
Масса сердца, на 100 г м.т.	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01
Суммационно-пороговый показатель (СПП), с	14,89 $\pm$ 0,69	15,88 $\pm$ 0,99	14,39 $\pm$ 0,94
Число заглядываний в норки за 3 мин	4,69 $\pm$ 0,77	1,54 $\pm$ 0,35 *	1,54 $\pm$ 0,45 *
Перемещения по квадратам за 3 мин	9,85 $\pm$ 1,63	4,23 $\pm$ 0,75 *	3,08 $\pm$ 0,52 *
Общее количество движений на «открытом поле» за 3 мин	18,77 $\pm$ 2,66	7,08 $\pm$ 1,24 *	5,85 $\pm$ 1,02 *
Эритроциты, 10^{12} /мл	7,64 $\pm$ 0,13	7,24 $\pm$ 0,13 *	7,79 $\pm$ 0,38
Гемоглобин, г/л	144,00 $\pm$ 1,24	133,54 $\pm$ 1,81 *	142,62 $\pm$ 6,90
Гематокрит, %	19,29 $\pm$ 0,21	18,10 $\pm$ 0,29 *	19,57 $\pm$ 1,02
Тромбоциты, 10^6 /мл	626,31 $\pm$ 34,83	632,62 $\pm$ 66,89	688,15 $\pm$ 59,33
Лейкоциты, 10^6 /мл	8,14 $\pm$ 0,48	10,86 $\pm$ 0,77 *	10,22 $\pm$ 0,82 *
Базофилы, %	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Эозинофилы, %	4,46 $\pm$ 0,42	5,00 $\pm$ 0,71	4,08 $\pm$ 0,73
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,38 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,00 *	1,00 $\pm$ 0,00 *
Сегментоядерные нейтрофилы, %	21,23 $\pm$ 0,98	30,85 $\pm$ 1,00 *	29,69 $\pm$ 1,02 *
Моноциты, %	5,69 $\pm$ 0,36	5,85 $\pm$ 0,30	5,69 $\pm$ 0,29
Лимфоциты, %	67,23 $\pm$ 1,14	57,31 $\pm$ 1,44 *	59,54 $\pm$ 1,20 *
Общий белок, г/л	75,25 $\pm$ 1,36	68,46 $\pm$ 1,16 *	72,73 $\pm$ 1,48**
Альбумин, г/л	38,92 $\pm$ 0,86	33,39 $\pm$ 0,68 *	34,52 $\pm$ 0,83*
Глобулин, г/л	36,33 $\pm$ 1,04	35,07 $\pm$ 0,72	37,28 $\pm$ 1,08
А/Г индекс	1,08 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,02 *	0,93 $\pm$ 0,03 *
ЩФ, Е/л	240,75 $\pm$ 13,37	242,57 $\pm$ 14,44	202,98 $\pm$ 8,53*•
АСТ, Е/л	330,16 $\pm$ 59,58	239,68 $\pm$ 20,04	229,09 $\pm$ 27,28
АЛТ, Е/л	94,39 $\pm$ 13,55	61,88 $\pm$ 4,20*	58,75 $\pm$ 3,09*
Коэф. де Ритиса	3,52 $\pm$ 0,15	3,92 $\pm$ 0,28	3,83 $\pm$ 0,28
Амилаза, Е/л	4714,62 $\pm$ 379,26	4939,31 $\pm$ 482,23	4685,69 $\pm$ 400,06
Билирубин общий, мкмоль/л	0,87 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,08
ЛДГ, Е/л	2961,11 $\pm$ 367,27	2405,01 $\pm$ 274,56	2670,77 $\pm$ 228,89
Креатинин, мкмоль/л	34,85 $\pm$ 1,54	34,65 $\pm$ 1,11	34,58 $\pm$ 1,21
ГГТП, Е/л	4,50 $\pm$ 0,83	4,07 $\pm$ 0,39	2,27 $\pm$ 0,46*•
Хс-ЛПВП, ммоль/л	1,18 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,05*	1,07 $\pm$ 0,09
Хс-ЛПНП, ммоль/л	0,14 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01*	0,24 $\pm$ 0,05*
Холестерин, ммоль/л	1,69 $\pm$ 0,05	1,62 $\pm$ 0,05	1,76 $\pm$ 0,13
Триглицериды, ммоль/л	1,10 $\pm$ 0,09	1,57 $\pm$ 0,12*	1,51 $\pm$ 0,09*
Мочевая кислота, мкмоль/л	157,33 $\pm$ 12,87	130,92 $\pm$ 9,95	121,58 $\pm$ 7,09*
Мочевина, ммоль/л	2,91 $\pm$ 0,25	2,86 $\pm$ 0,16	3,07 $\pm$ 0,20
SH-группы, ммоль/л	2,36 $\pm$ 0,73	8,28 $\pm$ 2,10*	4,74 $\pm$ 0,66*
Восстановленный глутатион в гемолизате крови, мкмоль/л	47,82 $\pm$ 8,54	32,32 $\pm$ 5,24	31,85 $\pm$ 4,99
Каталаза в сыворотке крови, мкмоль/л	0,53 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,04*
МДА в сыворотке крови, мкмоль/л	5,20 $\pm$ 0,72	3,54 $\pm$ 0,31*	4,25 $\pm$ 0,24
Церулоплазмин в сыворотке крови, мг/%	137,03 $\pm$ 12,34	197,90 $\pm$ 8,46*	196,15 $\pm$ 7,81*
Суточный объем мочи, мл	22,92 $\pm$ 2,62	17,15 $\pm$ 2,50	19,15 $\pm$ 2,71
Копропорфирин в моче, мкмоль/л	133,85 $\pm$ 22,81	175,09 $\pm$ 47,06	154,77 $\pm$ 31,27
Дельта-АЛК в моче	13,13 $\pm$ 1,39	20,99 $\pm$ 2,56*	39,79 $\pm$ 8,94*•
Креатинин в моче, ммоль/л	1,73 $\pm$ 0,22	2,12 $\pm$ 0,28	1,81 $\pm$ 0,17
Суточный клиренс креатинина, ммоль/сут.	0,97 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,10
Общий белок в моче, мг/л	225,12 $\pm$ 29,96	221,39 $\pm$ 34,33	172,10 $\pm$ 16,98
Мочевая кислота в моче, мкмоль/л	173,08 $\pm$ 16,13	258,46 $\pm$ 37,78*	219,83 $\pm$ 27,04
Мочевина в моче, ммоль/л	181,68 $\pm$ 18,87	259,21 $\pm$ 29,96*	205,39 $\pm$ 16,57

«*» статистически значимое отличие от контрольной группы,
«**» статистически значимое отличие от группы «NiO 11 нм» при ($p < 0,05$) по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферони
«*» statistically significant difference from the control group,
«**» statistically significant difference from the «NiO 11 nm» group ($p < 0.05$ by Student's t-test with Bonferroni correction)

Наночастицы NiO оказывают влияние на выделительную функцию почек, о чем свидетельствует повышение содержания мочевины и мочевой кислоты в моче (при действии малых НЧ статистически значимое).

Отмечается изменение со стороны как белой, так и красной крови. При введении НЧ как 11 нм, так и 25 нм наблюдается лейкоцитоз, снижение процента лимфоцитов и сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону сегментоядерных нейтрофилов. Содержание гемоглобина, а также число эритроцитов и гематокрит были снижены статистически значимо только при введении НЧ 11 нм, при введении НЧ 25 нм эти показатели практически не отличались от контрольных. Установление влияния различных химических форм никеля на эритропоэз не является чем-то новым, хотя описание подобного действия наночастиц этого металла ранее не встречалось. Наблюдали [29] усиленное образование эритропоэтина с повышением гематокрита у свинков и крыс при интравенальном введении субсульфида никеля. Вместе с тем известно и развитие анемии у крыс при интоксикации, например, хлоридом никеля [7].

Концентрация дельта-аминолевулиновой кислоты (дельта-АЛК) в моче была статистически значимо повышена при введении наночастиц обоих размеров по сравнению с контролем, но при введении НЧ 25 нм это повышение статистически значимо выше, чем при введении НЧ 11 нм. Поэтому можно допустить, что развитие никелевой анемии (подобно развитию свинцовой) хотя бы отчасти связано с токсическим торможением синтеза гема. Вместе с тем нельзя исключить и ее связи с усиленным эндогенным гемолизом, поскольку давно показано [31], что при никелевой интоксикации ускоряется развитие тех изменений эритроцитарной поверхности, по которым резидентные макрофаги красной пульпы селезенки распознают стареющие эритроциты и захватывают их из кровотока с последующим разрушением.

Кроме того, для никеля характерно фазовое действие на эритропоэз [2, 5], чем можно объяснить изменение показателей красной крови только при действии малых НЧ. Вероятнее всего, эта стадия при действии больших частиц еще не успела развиться либо компенсируется адаптационными резервами организма. Об этом свидетельствует повышение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови, статистически значимое в обеих группах. Его повышение происходит в ответ на анемию посредством активации транскрипции гена церулоплазмينا фактором (HIF-1), индуцируемым гипоксией [15, 24].

Кроме того, церулоплазмин обладает антиоксидантными свойствами, поскольку способен вызывать дисмутацию супероксид аниона, которая имеет не ферментативный, а стехиометрический характер. Таким образом, в отличие от других антиоксидантных ферментов [1], происходит восстановление O_2 до воды, а не до перекисей, чем и можно объяснить статистически значимое снижение уровня МДА в сыворотке крови при действии частиц 11-нанометрового размера.

Об изменении состояния антиоксидантной системы под влиянием НЧ NiO можно судить о заметно сниженной активности каталазы в сы-

воротке крови (при введении больших НЧ статистически значимой) и повышенном общем содержании SH-групп в сыворотке крови, значимом при введении обоих размеров НЧ NiO. Повышение этого показателя, часто наблюдаемое при действии токсичных металлов, может быть объяснено «развертыванием» глобулярной белковой молекулы при ее денатурации.

Наблюдалось системное торможение окислительно-восстановительного энергообмена при введении НЧ обоих размеров, однако более выраженное при введении частиц 11-нанометрового размера, которое было оценено по угнетению активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови. Это торможение многократно наблюдалось в экспериментах практически со всеми нанометаллами [18]. Однако располагавший сходной токсикологической интерпретацией показатель снижения уровня восстановленного глутатиона в цельной крови имел тенденцию к снижению.

Введенные НЧ NiO обладают способностью негативно влиять на липидный обмен. Так, под их воздействием в сыворотке крови были повышены триглицериды, снижены липопротеиды высокой плотности, повышены липопротеиды низкой плотности (ЛПНП). Повышение последних согласуется с повышенным церулоплазмином, способность которого ускорять окисление ЛПНП хорошо известна [12, 13, 20].

В обеих NiO-экспонированных группах заторможены как исследовательское поведение (число заглядываний в норки), так и общая двигательная активность (изменение перечисленных показателей статистически значимо), хотя относительная масса головного мозга была снижена статистически значимо при введении НЧ NiO малого размера и не изменена при введении НЧ большего диаметра.

Об изменении со стороны селезенки говорит увеличение ее относительного массового показателя, значимое при введении больших наночастиц (табл. 1), и гистопатологические изменения в ней. Некоторые морфометрические характеристики гистологических срезов селезенки свидетельствовали о более высоком спленотоксическом действии 25 нм НЧ NiO по сравнению с 11 нм (табл. 2). Это может быть объяснено тем, что в селезенке частиц диаметром 25 нм накапливалось в большей массе, чем частиц диаметром 11 нм. В печени накопление никеля одинаково как при введении 11 нм НЧ, так и 25 нм; в обоих органах содержание никеля намного выше, чем в органах контрольных крыс (табл. 3).

Такая разница в накоплении частиц может быть объяснена сложными соотношениями между более высокой способностью мельчайших НЧ к пенетрации из первичного депо в кровь и затем в клетки органов, с одной стороны, и их менее длительной ретенцией в клетках ввиду большей растворимости и цитотоксичности, с другой.

Как видно из рис. 2, НЧ NiO изучаемых размеров имели достаточно высокую растворимость даже в дистиллированной воде (за 90 часов растворяются 40 % частиц как 11 нм, так 25 нм), тем не менее, в сыворотке их растворение происходит еще интенсивнее – растворяются за это же время 50 % НЧ 25 нм и 90 % – НЧ 11 нм (рис. 3).

Таблица 2. Изменение отношения красной пульпы к белой при морфометрии селезенки после внутрибрюшинного введения наночастиц NiO крысам ($X \pm s.e.$)

Table 2. Change in the ratio of red pulp to white in the rat's spleen morphometry after intraperitoneal injection of NiO nanoparticles ($X \pm s.e.$)

Показатель	Значения показателя по группам крыс, подвергнутых введению		
	воды (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм
Отношение красной пульпы к белой	$7,71 \pm 1,62$	$4,27 \pm 0,067$	$3,50 \pm 0,49^{**}$

Примечание: «*» статистически значимое отличие от контрольной группы;

«**» статистически значимое отличие от группы «NiO 11 нм» при ($p < 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

Note: «*» statistically significant difference from the control group;

«**» statistically significant difference from the group «NiO 11 нм» ($p < 0,05$ by Student's t-test).

Таблица 3. Содержание никеля в органах после внутрибрюшинного введения крысам наночастиц NiO двух размеров в течение 6 недель, оцененное атомно-эмиссионной спектроскопией

Table 3. Nickel content in organs after rat's intraperitoneal injection of NiO nanoparticles of two sizes for 6 weeks, assessed by atomic emission spectroscopy

Органы	Значения содержания никеля, мкг ($X \pm s.e.$), в органах групп крыс, подвергнутых введению		
	воды (контроль)	NiO 11 нм	NiO 25 нм
Печень	$1,25 \pm 0,42$	$51,28 \pm 5,23^*$	$50,15 \pm 3,29^*$
Селезенка	$4,6 \pm 1,0$	$24,4 \pm 2,4^*$	$40,1 \pm 5,9^{**}$

Примечание: «*» статистически значимое отличие от контрольной группы;

«**» статистически значимое отличие от группы «NiO 11 нм» при ($p < 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

Note: «*» statistically significant difference from the control group;

«**» statistically significant difference from the group «NiO 11 нм» ($p < 0,05$ by Student's t-test).

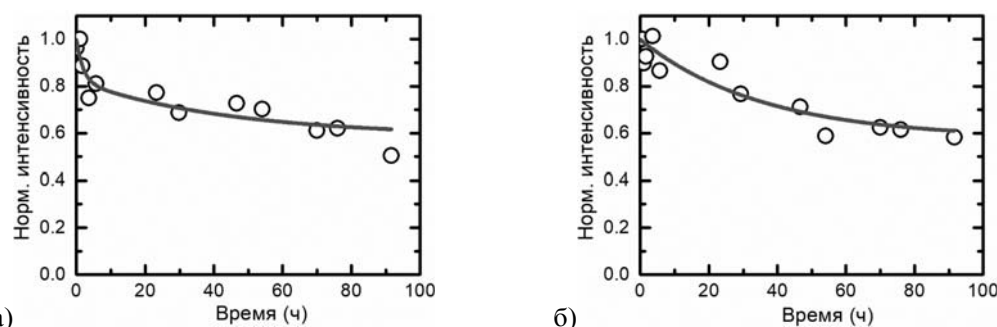


Рис. 2. Динамика растворения наночастиц NiO в дистиллированной воде а) NiO 11 нм, б) NiO 25 нм. Измерения проводились методом ЭПР

Fig. 2. Dynamics of dissolution of NiO nanoparticles in distilled water a) NiO 11 nm, b) NiO 25 nm. Measurements were carried out by EPR method

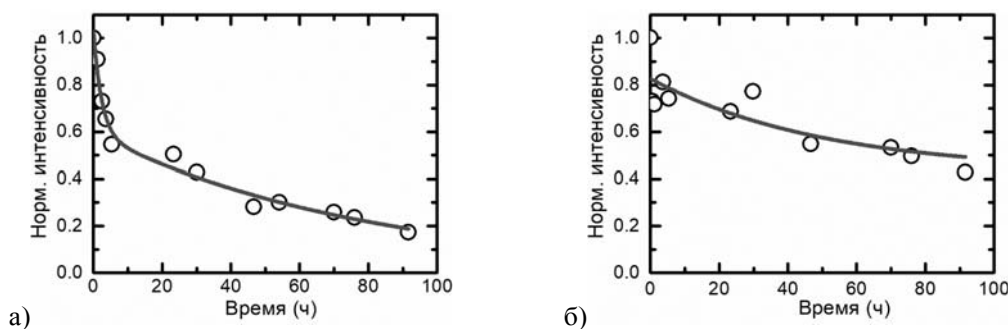


Рис. 3. Динамика растворения наночастиц NiO в сыворотке: а) NiO 11 нм, б) NiO 25 нм. Измерения проводились методом ЭПР

Fig. 3. Dynamics of NiO nanoparticles dissolution in serum a) NiO 11 nm, b) NiO 25 nm. Measurements were carried out by EPR method

Выводы:

1. В целом реагирование организма крысы на воздействие наночастиц оксида никеля соответствует общим характеристикам, которые присущи многим другим ранее изученным металлическим и металлооксидным наночастицам.

2. При равных массовых дозах наночастицы NiO вызывают разнообразные проявления системной субхронической токсичности с особо выраженным влиянием на функции печени, почек, антиоксидантную систему организма, липидный

обмен, белую и красную кровь, окислительно-восстановительный обмен, вызывают повреждение селезенки, некоторые нарушения нервной деятельности, предположительно связанные с возможностью проникновения в мозг никеля из крови.

3. Сравнительная субхроническая токсичность наночастиц оксида никеля двух размеров различна для разных по характеру эффектов и является неоднозначной в связи со сложными и нередко противоположно направленными соотношениями между биологической агрессивностью

стью наночастиц с одной стороны и сложными механизмами, контролирующими их биокинетику, с другой. Баланс между этими противоположными токсикокINETическими механизмами зависит от конкретных размеров и скоростей растворения частиц. В связи с этим, в частности, отмечается поражение селезенки, в которой накапливается больше никеля при введении 25-нанометровых частиц, чем при введении 11-нанометровых, более выражено под влиянием первых, в то время как вторые более токсичны по многим функциональным показателям на системно-организменном уровне.

4. При оценке рисков для здоровья, связанных с воздействием оксидов металлов нанометрового диапазона, следует учитывать возможную неодинаковость токсичности частиц разного размера внутри этого диапазона.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 7–35 см. References)

- Бердинских Н.К., Антоненко С.Г., Волосченко Ю.В., Чебатарев Е.Е., Гаврич И.Н. Роль церулоплазмينا в устойчивости организма к рентгеновскому облучению // Радиобиология. 1984. № 24. С. 199–203.
- Могилевская О.Я. Токсикология редких металлов. М., 1963. С. 151–164.
- Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В., Бокитко Б.Г., Гинсбург А.Л. и др. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов // Гигиена и санитария. 2007. № 6. С. 3–10.
- Прошенко Д.А. Система тестов для оценки токсичности наночастиц оксида никеля (II) на культуре фибробластов человека // Новое слово в науке и практике: гипотезы и апробация результатов исследований. 2016. № 23. С. 18–22.
- Рыжковский В.Л., Елфимова Е.В., Гусев М.И. Резорбтивное действие малых концентраций аэрозоля металлического никеля на организм // Гигиена и санитария. 1974. № 11. С. 8–13.
- Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (vivarium): СП 2.2.1.3218–14. М.: Федеральный центр гигиены эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. 15 с.

REFERENCES

- Berdinskikh N.K., Antonenko S.G., Voloschenko Yu.V., Chebatarov E.E., Gavrich I.N. Role of ceruloplasmin in the body's resistance to X-ray irradiation. *Radiobiologiya*, 1984, no. 24, pp. 199–203. (In Russ.)
- Mogilevskaya O.Ya. *Toxicology of rare metals*. Moscow, 1963, pp. 151–164. (In Russ.)
- Onishchenko G.G., Archakov A.I., Bessonov V.V., Bokit'ko B.G., Gintsburg A.L. et al. Metodicheskie podkhody k otsenke bezopasnosti nanomaterialov [Methodical approaches to the assessment of the nanomaterials safety]. *Gigiena i sanitariya*, 2007, no. 6, pp. 3–10. (In Russ.)
- Proshchenko D.A. Sistema testov dlya otsenki toksichnosti nanochastits oksida nikelya (II) na kulture fibroblastov cheloveka [Test system for the toxicity assessing of nickel oxide (II) nanoparticles on human fibroblast culture]. *Novoe slovo v nauke i praktike: gipotezy i aprobatsiya rezul'tatov issledovaniy*, 2016, no. 23, pp. 18–22. (In Russ.)
- Ryzhkovskii V.L., Elfimova E.V., Gusev M.I. Rezorbtivnoe deystvie mal'kh konsentratsii aerolya metalicheskogo nikelya na organizm [Resorptive effect of low concentrations of metallic nickel aerosol on the body]. *Gigiena i sanitariya*, 1974, no. 11, pp. 8–13. (In Russ.)
- Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustroystvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental'no-biologicheskikh klinik (vivarium): SP 2.2.1.3218–14 [Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivaria): SP 2.2.1.3218–14]. Moscow: Federal'nyi tsentr gigeny epidemiologii Rosptrebnadzora Publ., 2015. 15 p. (In Russ.)
- Adjroud O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environ Toxicol*, 2013, no. 28(5), pp. 290–298.
- Ates M., Demir V., Arslan Z., Camas M., Celik F. Toxicity of Engineered Nickel Oxide and Cobalt Oxide Nanoparticles to Artemia Salina in Seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2016, no. 227, pp. 70–78.
- Bastus N.G., Casals E., Socorro V.-C., Puentes V. Reactivity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological media. *Nanotoxicology*, 2008, no. 2, pp. 99–112.
- 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- β 1 activation in rats. *Human. Experimental Toxicology*, 2016, no. 36(8), pp. 802–812.
- Dekkers S., Ma-Hock L., Lynch I., Russ M., Miller M.R., Schins R.P.F., Keller J., Römer I., Küttler K., Strauss V., De Jong W.H., Landsiedel R., Cassee F.R. Differences in the toxicity of cerium dioxide nanomaterials after inhalation can be explained by lung deposition, animal species and nanoforms. *Inhal Toxicol*, 2018, no. 4, pp. 1–14.

- Exner M., Hermann M., Hofbauer R., Hartmann B., Kapiotis S., Gmeiner B. Homocysteine promotes the LDL oxidase activity of ceruloplasmin. *FEBS Lett*, 2002, no. 531, pp. 402–406.
- Feichtenhofer S., Fabjan J.S., Abuja P.M. Ceruloplasmin as low-density lipoprotein oxidase: activation by ascorbate and dehydroascorbate. *FEBS Lett*, 2001, no. 501(1), pp. 42–46.
- Gonga 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, no. 34, pp. 104–109.
- Ho V.T., Bunn H.F. Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, no. 223, pp. 175–180.
- Katsnelson B.A., Minigaliyeva I.A., Panov V.G., Privalova L.I., Varaksin A.N., Gurvich V.B., Sutunkova M.P. et al. Some patterns of metallic nanoparticles' combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, no. 86, pp. 351–364.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yermenko O.S. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: Are we defenseless against nanoparticles? *Int. J. Occup. Environ. Health*, 2010, no. 16, pp. 508–524.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Minigaliyeva I.A., Gurvich V.B., Shur V.Ya. et al. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity in vivo. *Bioactivity of Engineered Nanoparticles*. Springer, 2017, Ch. 11, pp. 259–319.
- Latvala S., Hedberg J., Di Bucchianico S., Möller L., Wallinder O.I., Elihn K. et al. Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles. *PLoS One*, 2016, no. 11(7): e0159684.
- Leoni V., Albertini R., Passi A., Abuja P.M., Borroni P., D'Erl G.M., De Luca G. Glucose accelerates copper- and ceruloplasmin-induced oxidation of low-density lipoprotein and whole serum. *Free Radic. Res.*, 2002, no. 36, pp. 521–529.
- Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Rad. Biol. Med.*, 2008, no. 44, pp. 1689–1699.
- Minigaliyeva I.A., Bushueva T.V., Fröhlich E., Meindl C., Panov V.G., Varaksin A.N. et al. Are in vivo and in vitro assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition of data obtained in some experiments with NiO and Mn₃O₄ nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, no. 109(1), pp. 393–404.
- Mirhafa A., Nazari M., Jahani D., Shaki F. Size-Dependent Neurotoxicity of Aluminum Oxide Particles: a Comparison Between Nano- and Micrometer Size on the Basis of Mitochondrial Oxidative Damage. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2018, no. 183(2), pp. 261–269.
- Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Fox P.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J. Biol. Chem.*, 2000, no. 275, pp. 21048–21054.
- Notter D.A., Mitrano D.M., Nowack B. Are nanosized or dissolved metals more toxic in the environment? A meta-analysis. *Environ Toxicol Chem.*, 2014, no. 33(12), pp. 2733–9.
- 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, no. 151(1).
- Oyabu T., Ogami A., Morimoto Y., Shimada M., Lenggong W., Okuyama K., Tanaka I. Biopersistence of inhaled nickel oxide nanoparticles in rat lung. *Inhal Toxicol*, 2007, no. 19 (Suppl 1), pp. 55–58.
- Sousa C.A., Soares H.M., Soares E.V. Toxic effects of nickel oxide (NiO) nanoparticles on the freshwater alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquat. Toxicol.*, 2018, no. 204, pp. 80–90.
- Sunderman F.W., Hopfer Jr. M., Reid M.C., Shen S.K., Kevorkian C.B. Erythropoietin-mediated erythrocytosis in rodents after intraneural injection of nickel subsulfide. *Yale J. Biol. Med.*, 1982, no. 55(2), pp. 123–136.
- Sutunkova M.P., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Konyshova L.K., Minigaliyeva I.A. et al. On the contribution of the phagocytosis and the solubilization to the iron oxide nanoparticles retention in elimination from lungs under long-term inhalation exposure. *Toxicology*, 2016, Vol. 363–364, pp. 19–28.
- Tkeshelashvili L., Tsakadze K., Khulusauri O. Effect of some nickel compounds on erythrocyte characteristics. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1989, no. 21(1), pp. 337–342.
- Utembe W., Potgieter K., Stefaniak A.B., Gulumian M. Dissolution and biodegradability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Part. Fibre Toxicol.*, 2015, no. 12, 11 p.
- Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Zvezdin V.N., Dovbysh A.A., Ulanova T.S., Smirnov S.A. et al. Comparative assessment of the effects of short-term inhalation exposure to Nickel oxide nanoparticles and microdispersed Nickel oxide. *Nanotechnologies in Russia*, 2016, no. 11(9–10), pp. 671–677.

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 Rosptrebnadzor e-mail: sutunkova@ymrc.ru

