

© Минигалиева И.А., Сутункова М.П., Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Панов В.Г., Гурвич В.Б., Чернышов И.Н., Соловьева С.Н., Макеев О.Г., Бушуева Т.В., 2021

УДК 615.9

Оценка комбинированной и сравнительной токсичности наночастиц оксида цинка и оксида меди в эксперименте *in vivo*

И.А. Минигалиева¹, М.П. Сутункова¹, Б.А. Кацнельсон¹, Л.И. Привалова¹, В.Г. Панов^{1,2}, В.Б. Гурвич¹, И.Н. Чернышов¹, С.Н. Соловьева¹, О.Г. Макеев³, Т.В. Бушуева¹

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

²ФГБУН Институт промышленной экологии Уральского отделения Российской академии наук, ул. С. Ковалевской, д. 20, г. Екатеринбург, 620990, Российская Федерация

³ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», ул. Репина, д. 3, г. Екатеринбург, 620028, Российская Федерация

Резюме. Введение. Наряду с целенаправленным производством многих металлических и оксидных наноматериалов, обладающих заданными свойствами (так называемые «инженерные» наночастицы), и их широким и разнообразным использованием в технике, науке и медицине с некоторыми старыми технологиями могут быть связаны еще более важные потенциальные риски для здоровья человека. Неинженерные (самопроизвольно возникающие) наночастицы оксида металла (далее – MeO-NЧ), образующиеся при дуговой сварке, металлургии стали и цветных металлов, загрязняют рабочее место и окружающий воздух вместе с субмикронными частицами тех же оксидов металлов размером > 100 нм. В частности, наиболее важными источниками побочного производства наночастиц оксида цинка являются первичная шлакка или переплавка латуни, представляющей собой сплав меди и цинка в различных пропорциях (иногда с гораздо меньшей примесью свинца, олова и других металлов). Обоснованием проведения исследования сравнительной и комбинированной токсичности наночастиц оксида цинка (далее – ZnO-NЧ) и наночастиц оксида меди (далее – CuO-NЧ) является их одновременное присутствие в аэрозольных выбросах, образующихся при металлургии латуни. Цель настоящего исследования – провести оценку комбинированной и сравнительной токсичности ZnO-NЧ и CuO-NЧ. Методы. Стабильные суспензии MeO-NЧ, полученные методом лазерной абляции из металлической пластинки (чистота 99,99 %) цинка и меди под слоем деионизированной воды, вводили внутривенно беспородным крысам-самцам 18 раз в течение 6 недель отдельно (в равных массовых дозах) или в комбинации для сравнительной оценки и анализа типа комбинированного действия изучаемых наночастиц по большому количеству признаков (включая фрагментацию ДНК). Результаты. Установлено, что, судя по некоторым прямым и косвенным свидетельствам, субхроническое воздействие ZnO-NЧ на организм является более опасным по сравнению с воздействием CuO-NЧ. Математическое описание результатов с помощью методологии поверхности отклика показало, что, как и в случае любых других ранее исследованных нами бинарных токсических комбинаций, реакция организма на одновременное воздействие исследуемых MeO-NЧ характеризовалась сложным взаимодействием различных видов комбинированной токсичности в зависимости от того, по какому эффекту она оценивалась, а также от уровней эффекта и доз. При анализе типа комбинированного действия ZnO-NЧ и CuO-NЧ по некоторым показателям состояния организма был выявлен антагонизм, а по другим показателям выявилась аддитивность, что заставляет оценивать их совместное воздействие как опасное.

Ключевые слова: эксперимент, наночастицы оксида цинка, наночастицы оксида меди, комбинированная токсичность. Для цитирования: Минигалиева И.А., Сутункова М.П., Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Панов В.Г., Гурвич В.Б., Чернышов И.Н., Соловьева С.Н., Макеев О.Г., Бушуева Т.В. Оценка комбинированной и сравнительной токсичности наночастиц оксида цинка и оксида меди в эксперименте *in vivo* // Здоровье населения и среда обитания. 2021. № 6 (339). С. 34–40. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-339-6-34-40>

Информация об авторах:

✉ Минигалиева Ильзира Амировна – д-р биол. наук, зав. отделом токсикологии и биофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: ilzira-minigaliyeva@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1871-8593>.

Сутункова Марина Петровна – д-р мед. наук, директор ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: sutunkova@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>.

Кацнельсон Борис Александрович – д-р мед. наук, профессор, научный консультант ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: bkaznelson@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8750-9624>.

Привалова Лариса Ивановна – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией научных основ биофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: privalova@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>.

Панов Владимир Григорьевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории промышленной токсикологии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, ст. науч. сотр. лаборатории математического моделирования в экологии и медицине ИПЭ УрО РАН; e-mail: panov.wladimir@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6718-3217>.

Гурвич Владимир Борисович – д-р мед. наук, научный руководитель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: gurvich@ymrc.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6475-7753>.

Чернышов Иван Николаевич – мл. науч. сотр. отдела токсикологии и биофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: chernishov@ymrc.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2018-5386>.

Соловьева Светлана Николаевна – заведующий клиникой экспериментальных животных ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: solovyevasn@ymrc.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8580-403X>.

Макеев Олег Германович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой медицинской биологии и генетики Уральского государственного медицинского университета; e-mail: larim@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6819-3185>.

Бушуева Татьяна Викторовна – канд. мед. наук, заведующий НПО лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; e-mail: bushueva@ymrc.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5872-2001>.

Assessment of Combined and Comparative Toxicity of Zinc Oxide and Copper Oxide Nanoparticles in the *In Vivo* Experiment

I.A. Minigaliyeva,¹ M.P. Sutunkova,¹ B.A. Katsnelson,¹ L.I. Privalova,¹ V.G. Panov,^{1,2} V.B. Gurovich,¹ I.N. Chernyshov,¹ S.N. Solovyeva,¹ O.G. Makeyev,³ T.V. Bushuyeva¹

¹Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 30 Popov Street, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation

²Institute of Industrial Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 20 Sofia Kovalevskaya Street, Yekaterinburg, 620990, Russian Federation

³Ural State Medical University, 3 Repin Street, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

Summary. Introduction: Apart from the targeted production of many metal and oxide nanomaterials with desired properties (so-called engineered nanoparticles) and their wide and diverse use in engineering, science, and medicine, even more important potential health risks to human health may be associated with some old technologies. Non-engineered metal oxide nanoparticles

(MeO-NPs) generated spontaneously during arc welding, production of steel and non-ferrous metals, pollute the workplace and ambient air along with submicron particles (> 100 nm) of the same metal oxides. The most important sources of by-production of zinc oxide nanoparticles include primary smelting or re-smelting of brass, an alloy of copper and zinc of various proportions (sometimes with a much lower amount of lead, tin, and other metals). The rationale of the study of the comparative and combined toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) and copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) is their simultaneous presence in aerosol emissions from brass metallurgy. The *objective* of our study was to estimate the comparative and combined toxicity of ZnO-NPs and CuO-NPs. *Methods*: Stable suspensions of MeO-NPs obtained by laser ablation of 99.99 % pure zinc and copper under a layer of deionized water, were injected intraperitoneally 18 times during 6 weeks to outbred male rats separately (in equal mass doses) or in combination for a comparative assessment and analysis of the type of the combined exposure to the studied nanoparticles for a large number of signs (including DNA fragmentation). *Results*: We established that, judging by some direct and indirect evidence, the subchronic effect of ZnO-NPs on the body was more detrimental than that of CuO-NPs. The mathematical description of the results using the response surface method showed that, similar to other previously studied binary toxic combinations, the response of the body to the combined exposure to CuO and ZnO nanoparticles was characterized by a complex interaction of various types of combined toxicity, depending on the effect it was evaluated for, the levels of the effect and doses. When analyzing the type of the combined effect of ZnO-NPs and CuO-NPs, we observed both the antagonism and additivity according to some indicators of the state of the body, which makes us evaluate their combined exposure as dangerous.

Keywords: experiment, zinc oxide nanoparticles, copper oxide nanoparticles, combined toxicity.

For citation: Minigaliyeva IA, Sutunkova MP, Katsnelson BA, Privalova LI, Panov VG, Gurvich VB, Chernyshov IN, Solovyeva SN, Makeyev OG, Bushuyeva TV. Assessment of combined and comparative toxicity of zinc oxide and copper oxide nanoparticles in the *in vivo* experiment. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2021; (6(339)):34-40. (In Russian). doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-339-6-34-40>

Author information:

✉ Ilzira A. **Minigaliyeva**, D.Biol.Sc., Head of the Department of Toxicology and Bioprophylaxis, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: ilzira-minigaliyeva@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1871-8593>.

Marina P. **Sutunkova**, MD, D.M.Sc., Director, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: marinasutunkova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>.

Boris A. **Katsnelson**, MD, D.M.Sc., Professor, Research Adviser, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor, e-mail: bkaznelson@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8750-9624>.

Larisa I. **Privalova**, MD, D.M.Sc., Professor, Chief Research Scientist, Head of the Laboratory of Scientific Foundations of Biological Prophylaxis, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: privalovali@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>.

Vladimir G. **Panov**, Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Senior Research Scientist, Department of Toxicology and Bioprophylaxis, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; Senior Research Scientist, Laboratory of Mathematical Modeling in Ecology and Medicine, Institute of Industrial Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; e-mail: vpanov@ecko.uran.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6718-3217>.

Vladimir B. **Gurvich**, D.M.Sc., Scientific Director, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: gurvich@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6475-7753>.

Ivan N. **Chernyshov**, Junior Research Scientist, Department of Toxicology and Bioprophylaxis, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: chernyshov@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2018-5386>.

Svetlana N. **Solovyeva**, Head of the Experimental Animal Clinic, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: solovyevasn@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8580-403X>.

Oleg G. **Makeyev**, D.M.Sc., Professor, Head of the Department of Medical Biology and Genetics, Ural State Medical University; e-mail: larim@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6819-3185>.

Tatiana V. **Bushuyeva**, Candidate of Medical Sciences, Head of Scientific and Production Association of Laboratory and Diagnostic Technologies, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor; e-mail: bushuyeva@ymrc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5872-2001>.

Введение. Потенциальные риски для здоровья человека несут не только традиционные технологические процессы, но и стремительно развивающиеся новые, такие как производство металлических и оксидных наноматериалов, обладающих заданными свойствами (так называемые «инженерные» наночастицы), и их широкое и разнообразное использование в технике, науке и медицине.

Образующиеся при электродуговой сварке и металлургических производствах «инженерные», то есть самопроизвольно возникающие, MeO-NЧ загрязняют рабочее место и окружающий воздух вместе с субмикронными частицами тех же оксидов металлов размером > 100 нм. В частности, наиболее важным источником загрязнения ZnO-NЧ и CuO NЧ является первичная плавка или переплавка латуни, представляющей собой сплав меди и цинка в различных пропорциях (иногда с гораздо меньшей примесью свинца, олова и других металлов).

Цель настоящего исследования – провести оценку комбинированной и сравнительной токсичности ZnO-NЧ и/или CuO-NЧ.

Материал и методы: суспензии MeO-NЧ получали методом лазерной абляции металли-

ческих мишеней (чистота 99,99 %) под слоем деионизированной воды [1].

Этот метод обеспечивал достаточно узкое распределение НЧ по размерам, и, хотя синглетные MeO-NЧ имеют тенденцию слипаться, образующиеся агрегаты обычно рыхлые и довольно мелкие (рис. 1 и 2). В то время как CuO-NЧ были практически сферическими со средним (\pm sd) диаметром $24,5 \pm 4,8$ нм, ZnO-NЧ имели стержневидную форму с размерами $83 \pm 20 \times 30 \pm 11$ нм. Стабильность суспензии характеризовалась высокой величиной дзета-потенциала, измеренного методом электрофоретического рассеяния света с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Эксперименты проводились на беспородных белых крысах-самцах собственного разведения с начальной массой тела около 200 г, которые были подвергнуты в течение 6 недель 18 внутривенным инъекциям.

Каждая группа животных состояла из 12 крыс. Группе 1 вводили ZnO-NЧ в дозе 0,5 мг в 1,0 мл суспензии плюс 2,0 мл деионизированной воды.

Группе 2 вводили CuO-NЧ в дозе 0,5 мг в 1,0 мл суспензии плюс 2,0 мл деионизированной воды.

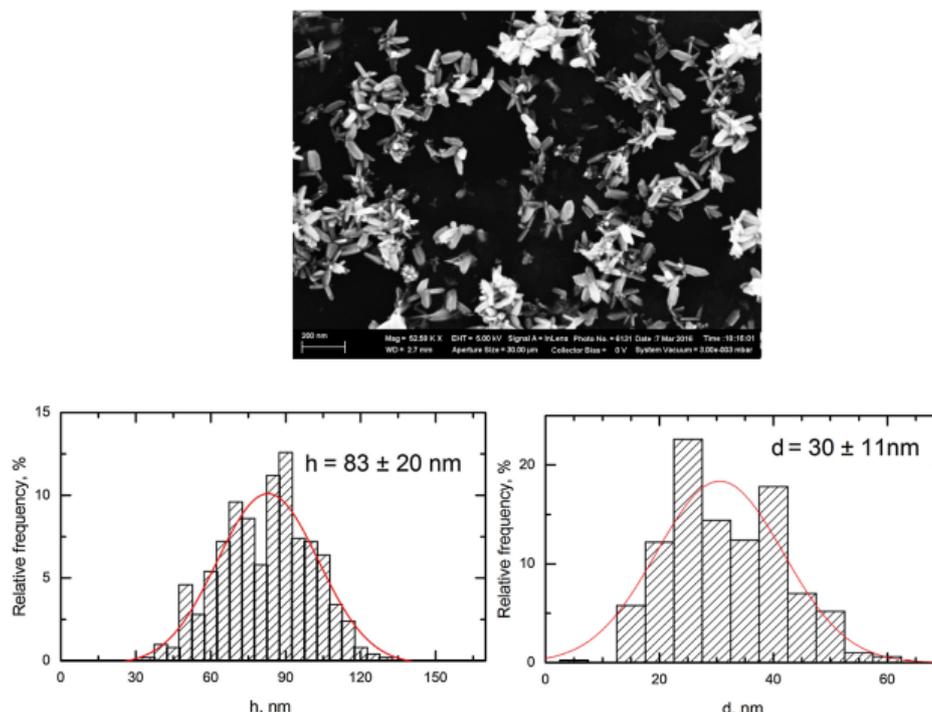


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) изображений наночастиц ZnO, подготовленных для эксперимента (увеличение $\times 52\,580$), и функции распределения частиц по размерам (h – высота, d – диаметр), полученные анализом СЭМ-изображений

Fig. 1. SEM images of ZnO nanoparticles made for the experiment (magnification $\times 52,580$); particle size distribution functions (h – height, d – diameter) obtained by the analysis of SEM images

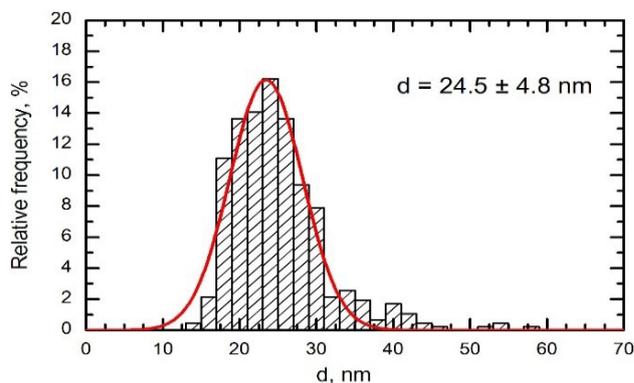
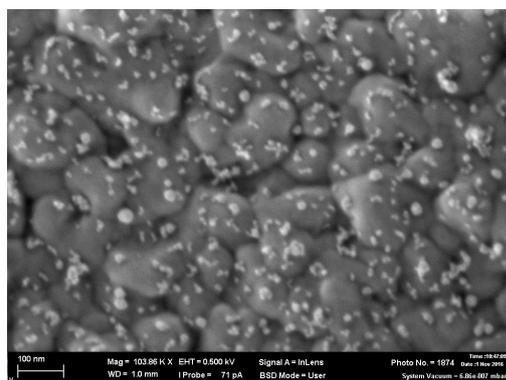


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) изображений наночастиц CuO, подготовленных для эксперимента (увеличение $\times 103\,860$), и функция распределения частиц по размерам, полученная анализом СЭМ-изображений

Fig. 2. SEM images of CuO nanoparticle made for the experiment (magnification $\times 103,860$); the particle size distribution function obtained by the analysis of SEM images

Группе 3 вводили ZnO-НЧ + CuO-НЧ в дозе 0,5 мг на каждый MeO-НЧ в 1,0 мл соответствующей суспензии плюс 1,0 мл деионизированной воды.

Группе 4 (контроль) вводили 3,0 мл деионизированной воды.

Крыс содержали в обычных конвенциональных клетках, условия содержания и кормления соответствовали необходимым требованиям^{1,2}. Эксперименты планировались и проводились в соответствии с международными принципами

исследований³ и были одобрены Комитетом по биоэтике ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора (протокол № 59 от 18.01.2016).

После периода воздействия ZnO-НЧ и/или CuO-НЧ у всех животных определяли массу тела (% прироста массы тела), суммационно-пороговый показатель (СПП)⁴, «норковый рефлекс» (оценивался числом заглядываний в отверстия («норки») специальной испытательной доски

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

² ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

³ «International guiding principles for biomedical research involving animals» разработанного «Council for International Organizations of Medical Sciences» и «International Council For Laboratory Animal Science» (2012).

⁴ Елизарова О.Н. Пособие по токсикологии для лаборантов. М.: Медицина, 1974. С. 77.

за 3 минуты)⁵. Также осуществляли сбор суточной мочи для анализа ее плотности, диуреза и содержания копропорфирина, дельта-аминолевулиновой кислоты (δ -АЛК), креатинина и соответствующих токсических элементов.

После умерщвления животных были получены массовые значения некоторых внутренних органов – печени, селезенки, почек и головного мозга. Биохимические показатели крови (общий белок в сыворотке крови, альбумин, глобулин, триглицериды, холестерин, билирубин, церулоплазмин, восстановленный глутатион, малонилдальдегид (МДА), щелочную фосфатазу, аланин- и аспараттрансминазы (АлАТ, АсАТ), каталазу, креатинин, пролактин, тестостерон, фолликулостимулирующий, лютеинизирующий гормоны и др.) исследовали с помощью тест-систем. Для определения содержания гемоглобина, гематокрита, тромбоцита, среднего объема эритроцитов, а также количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов был использован гематологический анализатор МУТНИС-18. Долю ретикулоцитов подсчитывали по рутинной методике⁶. Цитохимическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах основывалось на восстановлении нитротетразолиевого фиолетового до формазана, количество гранул которого в клетке подсчитывали при иммерсионной микроскопии [2]. Фрагментацию геномной ДНК оценивали на ядерных клетках циркулирующей крови с помощью теста ПДАФ [3–5]. Всего было получено 53 показателя.

Содержание металлов в органах и моче определяли с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС).

Статистическую значимость различий между средними арифметическими значениями группы оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Как и в большинстве проведенных нами ранее исследований по анализу закономерностей двухфакторной комбинированной токсичности, в этой работе также был использован метод построения поверхности отклика (the Response Surface Methodology – RSM).

Уравнение регрессии, описывающее функцию отклика $Y(x_1, x_2)$, в нашем случае имеет вид:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

где Y – тот или иной показатель токсичности, x_1 и x_2 – дозы CuO-НЧ и ZnO-НЧ, соответственно. Постоянный член уравнения b_0 , коэффициенты регрессии для каждой независимой переменной b_1 , b_2 и коэффициент регрессии для их комбинации b_{12} подбирались по экспериментальным данным на основе того же критерия наименьшей суммы квадратов отклонений.

Принимается, что комбинированное действие двух факторов является однонаправленным, если ответ Y в обеих однофакторных функциях $Y(x_1, 0)$ и $Y(0, x_2)$ возрастает или снижается с увеличением x_1 или x_2 , и противоположно направленным, если Y в одной функции при

этом возрастает, а в другой снижается. Теория метода RSM показывает, что даже на основе эксперимента, в котором использовались только по два уровня каждого воздействия, уравнение (1) позволяет прогнозировать значение Y для любой комбинации x_1 и x_2 в пределах этих уровней [6].

Результаты. В табл. 1 представлены средние значения только статистически значимых функциональных показателей состояния организма крыс, исключая те показатели, по которым не было обнаружено статистически значимого отклонения экспонированных групп от контрольной в данном эксперименте. Принимая во внимание, что работа была сосредоточена на исследовании основных закономерностей сравнительной и комбинированной нанотоксичности, а не на характеристике токсичности специфических MeO-НЧ, этим результатам мы не уделяем особого внимания, тем более что в литературе имеется немало информации о токсичности ZnO-НЧ [7–15] и особенно о Cu- или CuO-НЧ [18–30].

Данные табл. 1 свидетельствуют, что 7 показателей общего состояния организма статистически значимо отличались от соответствующих контрольных значений у крыс, подвергшихся воздействию ZnO-НЧ, 10 – у подвергшихся воздействию CuO-НЧ, и 8 – у подвергшихся комбинированному воздействию. Только по пяти показателям выявлены статистически значимые различия между группами на MeO-НЧ при сравнении, а именно: доля ретикулоцитов, альбумин и креатинин в сыворотке крови, креатинин в моче, эндогенный клиренс креатинина; признак этих различий варьирует в зависимости от того или иного показателя. Принимая во внимание возможную стимулирующую эритропоэз роль добавок Zn [29], заметное увеличение ретикулоцитов (связанное с последовательными, хотя и не значимыми статистически, сдвигами количества эритроцитов, гематокрита и гемоглобина), наблюдаемое при воздействии только ZnO-НЧ, может быть гипотетически оценено как благоприятное, а не неблагоприятное.

Изоболограммы (рис. 3) иллюстрируют зависящее от исхода разнообразие комбинированной токсичности (ZnO-НЧ + CuO-НЧ).

Статистически значимое увеличение коэффициента фрагментации геномной ДНК в ядросодержащих клетках крови наблюдалось как при изолированном, так и при комбинированном воздействии MeO-НЧ.

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 2, каждое изолированное субхроническое воздействие того или иного вида MeO-НЧ приводило к тому, что соответствующее содержание металлов в крови, моче и кале было существенно и статистически значимо выше контрольного значения.

В то же время, хотя концентрация меди в крови в ответ даже на один только ZnO-НЧ была на порядок ниже, чем при воздействии CuO-НЧ, тем не менее она была примерно в 3 раза (и статистически значимо) выше контрольного

⁵ Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования. Кишинев, 1980. 47 с.

⁶ Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина, 1987. С. 368.

Таблица 1. Некоторые функциональные показатели состояния крыс после повторных инъекций суспензий наночастиц ZnO-НЧ и/или CuO-НЧ ($\bar{X} \pm Sx$)

Table 1. Some functional indicators of rats after repeated injections of ZnO-NPs and/or CuO-NPs ($\bar{X} \pm Sx$) suspensions

Показатель / Indicator	Контроль / Control	ZnO-НЧ / ZnO-NPs	CuO-НЧ / CuO-NPs	ZnO + CuO NPs
Прирост массы тела в % / Body mass gain, %	34.10 ± 2.51	27.34 ± 2.34	26.63 ± 2.55*	21.99 ± 1.92*
Суммационно-пороговый показатель, сек. / Temporal summation of sub-threshold impulses, sec.	14.02 ± 1.28	17.33 ± 1.00	18.02 ± 0.72*	15.89 ± 1.23
Количество пересеченных квадратов за 3 мин. / Number of crossed squares during 3 min	15.75 ± 2.18	8.58 ± 1.18*	10.25 ± 1.94	6.17 ± 1.25*
Ретикулоциты, ‰ / Reticulocytes, ‰	11.5 ± 1.33	20.92 ± 1.86*	13.25 ± 1.60	31.67 ± 1.22*
Тромбоциты, 103/мкл / Thrombocytes, 103/ μ L	790.50 ± 53.19	909.00 ± 50.00	854.50 ± 34.64	976.50 ± 65.65*
Тромбоцитрит, % / Thrombocrit, %	0.49 ± 0.03	0.59 ± 0.03*	0.53 ± 0.02	0.63 ± 0.05*
Лимфоциты, % / Lymphocytes, %	75.13 ± 0.64	72.00 ± 0.33*	73.25 ± 1.33	74.50 ± 0.85
Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), количество гранул формазана в 50 лимфоцитах / Succinate dehydrogenase (SDH) activity, number of formazane granules per 50 lymphocytes	703.67 ± 35.46	634.22 ± 29.06	582.89 ± 25.76*	601.50 ± 46.49
Альбумины в сыворотке крови, г/л / Serum albumin, g/L	43.18 ± 0.62	40.88 ± 1.10	37.43 ± 0.98*	42.33 ± 0.74
А/Г индекс / A/G index	1.47 ± 0.07	1.30 ± 0.08	1.18 ± 0.08*	1.53 ± 0.05
Креатинин в сыворотке крови, мкмоль/л / Serum creatinine, μ mol/L	31.93 ± 1.33	32.68 ± 0.98	37.25 ± 1.28*	31.79 ± 1.12
Щелочная фосфатаза в сыворотке крови, Е/л / Serum alkaline phosphatase, U/L	236.81 ± 25.2	158.35 ± 10.5*	159.28 ± 19.8*	163.49 ± 13.4*
Фолликулостимулирующий гормон в сыворотке крови, МЕ/л / Follicle-stimulating hormone in blood serum, IU/L	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.25 ± 0.03*	0.18 ± 0.04
Объем мочи, мл / Urine volume, mL	25.00 ± 4.10	44.86 ± 2.46*	40.00 ± 1.85*	42.57 ± 3.58*
Коэффициент фрагментации геномной ДНК в ядродержащих клетках крови / Nucleated blood cell DNA fragmentation coefficient	0.4240 ± 0.0005	0.4446 ± 0.0005*	0.4330 ± 0.0003*	0.4842 ± 0.0005*

Примечания: 1) Звездочкой (*) отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от соответствующих контрольных ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

2) Статистически значимыми ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони) являются также различия между группами, подвергшимися воздействию к ZnO-НЧ против CuO-НЧ (по доле ретикулоцитов; альбумину и креатинину в сыворотке крови); к (ZnO-НЧ+CuO-НЧ) против ZnO-НЧ (по количеству лимфоцитов, доле ретикулоцитов).

Notes: 1) An asterisk * indicates the values that are statistically and significantly different from the corresponding control values ($p < 0.05$ according to Student's t-test)

2) Statistically significant differences ($p < 0.05$ according to Student's t-test with Bonferroni correction) are also ones between the groups exposed to ZnO-NPs vs CuO-NPs (by the content of reticulocytes; albumin and creatinine in blood serum, creatinine in urine; to endogenous creatinine clearance); to (ZnO-NPs + CuO-NPs) vs ZnO-NPs (by the number of lymphocytes, the rate of reticulocytes, globulins and ceruloplasmin in blood serum).

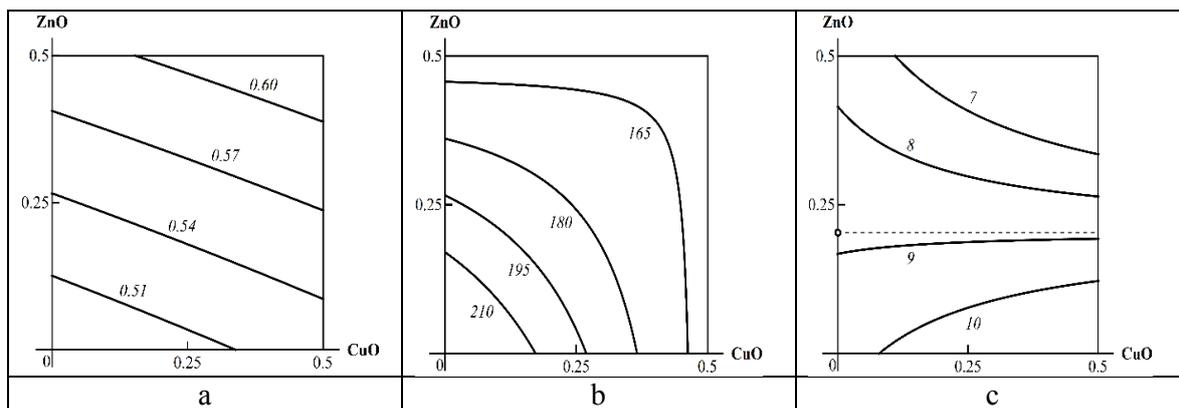


Рис. 3. Примеры изобол, характеризующих комбинированную субхроническую токсичность CuO-НЧ + ZnO-НЧ: а) для тромбоцитрит (аддитивность); б) для активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови (антагонизм); в) для тестостерона (синергизм однонаправленного действия при низких уровнях эффекта и противоположно направленного действия при высоких уровнях эффекта). Дозы CuO и ZnO приведены по осям в мг на крысу.

Число в строках изобол показывает величину эффекта Y (АФ в МЕ/л; тестостерон в нмоль/л)
 Fig. 3. Examples of isoboles showing the combined subchronic toxicity of CuO-NPs+ZnO-NPs: a) for thrombocrit (additivity); b) for the activity of alkaline phosphatase (ALP) (antagonism); c) for testosterone (synergism of unidirectional action at low levels of effect and oppositely directed action at high levels of effect). The doses of CuO and ZnO are shown on the axes in mg per rat. The number in the isobol lines shows the magnitude of the effect Y (AF in IU/L; testosterone in nmol/L)

значения. Этот парадокс гипотетически может быть объяснен ослабленной элиминационной активностью токсически поврежденных органов экскреции (как для металлов, так и для почек, и в основном печени), гипотеза которой подтверждается сниженным содержанием меди в моче и особенно в кале. Однако уровень

цинка в крови повышался только в ответ на изолированные и комбинированные воздействия, включающие ZnO-НЧ. Мы не можем объяснить эту диссимметрию медно-цинковых токсикокинетических взаимодействий.

В нашем эксперименте массовые дозы двух MeO-НЧ были равны, что, по-видимому,

Таблица 2. Содержание меди и цинка в крови, моче и кале крыс после повторных внутрибрюшинных инъекций суспензий наночастиц CuO и/или ZnO ($\bar{X} \pm S_x$)Table 2. Copper and zinc contents in the blood, urine and feces of rats after repeated intraperitoneal injections of CuO and/or ZnO nanoparticle suspensions ($\bar{X} \pm S_x$)

Металл / Metal	Группы крыс, подвергшихся воздействию MeO-НЧ / Groups of rats exposed to MeO-NPs			
	Контроль / Control	CuO	ZnO	CuO + ZnO
В крови, мкг/мл / In blood, µg/mL				
Cu	0.038 ± 0.008	1.394 ± 0.077*	0.131 ± 0.006*	1.313 ± 0.065*
Zn	0 ± 0	0 ± 0	2.64 ± 0.121*	2.105 ± 0.069*
В моче, мкг/мл / In urine, µg/mL				
Cu	0.016 ± 0.002	0.034 ± 0.002*	0.011 ± 0.001*	0.036 ± 0.003*
Zn	0 ± 0	0.006 ± 0.002*	0.057 ± 0.003*	0.063 ± 0.002*
В кале, мкг/г / In feces, µg/g				
Cu	0.373 ± 0.099	10.642 ± 0.572*	0.129 ± 0.045*	10.667 ± 0.679*
Zn	0 ± 0	0 ± 0	65.02 ± 3.436*	54.236 ± 1.694*

Примечания: 1) Звездочкой (*) отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от соответствующих контрольных ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони). 2) Статистически значимыми ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони) являются также различия между группой, подвергшейся воздействию CuO-НЧ, и группой, подвергшейся воздействию ZnO-НЧ (по всем показателям, кроме равных нулю); между группой, подвергшейся воздействию бинарной комбинации (CuO + ZnO), и группой, подвергшейся воздействию ZnO-НЧ (по Cu в крови; Zn в крови; Cu в кале и Zn в кале).

Notes: 1) An asterisk * indicates the values that are statistically and significantly different from the corresponding control ones ($p < 0.05$ according to Student's t-test with Bonferroni correction). 2) Statistically significant differences ($p < 0.05$ according to the Student's t-test with Bonferroni correction) are also the ones between the group exposed to CuO-NPs and the group exposed to ZnO-NPs (for all indicators except equal to zero); between the group exposed to the binary combination (CuO + ZnO) and the group exposed to ZnO-NPs (for Cu in blood; Zn in blood; Cu in feces and Zn in feces).

оправдывает сравнение их эффектов. Однако мы не можем быть уверены, что различия между этими эффектами были обусловлены только различной химической природой НЧ-составляющих металлов, поскольку эти MeO-НЧ заметно отличаются и по геометрии: если CuO-НЧ сферичные, то ZnO-НЧ стержневидные. Поскольку важнейшие первичные механизмы токсичности НЧ реализуются на поверхности частиц, то имеет смысл сравнивать дозы, использованные в данном эксперименте, не по массе, а по удельной поверхности. Простой расчет показал, что удельная поверхность (выраженная в $1015 \text{ nm}^2/\text{mg}$) равна 38,5 для CuO-НЧ и 14,0 для ZnO-НЧ. Таким образом, при сравнении токсических эффектов ZnO-НЧ и CuO-НЧ, вводимых в равных массовых дозах, следует учитывать, что удельная поверхность первого значительно больше. Между тем, при сравнении этих эффектов не было заметной количественной разницы, и некоторые из них (например, связанные с метаболизмом порфирина, эритропоэзом и др.) были, хотя и незначительно, еще более выражены при воздействии только ZnO-НЧ.

Следует отметить, проблема влияния формы и удельной поверхности наночастиц на проявления их токсических свойств безусловно важна и подлежит дальнейшему изучению.

Показана неоднозначная зависимость комбинированного типа токсичности для одной и той же пары токсикантов, включая MeO-НЧ, от эффекта, по которому оценивается этот вид, и от его уровня, обнаруженного в данном эксперименте, что полностью согласуется с результатами других наших исследований [1, 30–34]. Особо неблагоприятное значение имеет аддитивность показателя фрагментации геномной ДНК ZnO-НЧ и CuO-НЧ, которую мы наблюдали и в других экспериментах на животных (например, с SiO_2 , TiO_2 и Al_2O_3 НЧ, действующими в различных бинарных и тройных комбинациях [1]).

Мы считаем теоретически интересным и практически важным, что, хотя именно

антагонизм цинка и меди как незаменимых микроэлементов, так и в более высоких токсичных дозах широко признан в литературе [35], доказана не столь однородная картина их совместного действия в виде наночастиц.

Выводы

Основные выводы из результатов этого исследования заключаются в следующем.

1. Судя по некоторым прямым и косвенным показателям, субхроническое воздействие наночастиц оксида цинка на организм более опасно по сравнению с воздействием наночастиц оксида меди.

2. Среди многочисленных неблагоприятных исходов комбинированного воздействия наночастиц увеличение коэффициента фрагментации геномной ДНК в эксперименте *in vivo* можно считать наиболее неблагоприятным, поскольку он является детерминантой вероятной генотоксичности.

3. Хотя антагонизм однонаправленного действия этих двух нанотоксикантов и даже их противонаправленное действие на одни показатели состояния организма оказались возможными, на другие – аддитивными, это заставляет оценивать их совместное воздействие как особо опасное.

Информация о вкладе авторов: И.А. Минигалиева – разработка дизайна исследования, написание текста рукописи; М.П. Сутункова – разработка дизайна исследования, анализ полученных данных; Б.А. Кацнельсон – разработка дизайна исследования, анализ полученных данных; Л.И. Привалова – разработка дизайна исследования; анализ полученных данных; В.Г. Панов – получение данных для анализа, анализ полученных данных; В.Б. Гурвич – разработка дизайна исследования; И.Н. Чернышов – получение данных для анализа, анализ полученных данных; С.Н. Соловьева – получение данных для анализа, анализ полученных данных; О.Г. Макеев – получение данных для анализа; Т.В. Бушуева – получение данных для анализа

Финансирование: исследование проводилось в рамках отраслевой программы «Гигиеническое научное обоснование минимизации рисков здоровью населения России» (2020–2016).

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы
(пп. 1, 3–37 см. References)

2. Нарциссов Р.П. Применение п-нитротетразоли фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1969. № 5. С. 85–91.

References

1. Minigalieva IA, Katsnelson BA, Privalova LI, et al. Combined subchronic toxicity of aluminum (III), titanium (IV) and silicon (IV) oxide nanoparticles and its alleviation with a complex of bioprotectors. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):837. doi: 10.3390/ijms19030837
2. Nartsissov RP. [Application of n-nitrotetrazole violet for quantitative cytochemistry of human lymphocyte dehydrogenases.] *Arkhiv Anatomii, Gistologii i Embriologii.* 1969;(5):85–91. (In Russian).
3. Wang S, Ding M, Duan X, et al. Detection of the single nucleotide polymorphism at position rs2735940 in the human telomerase reverse transcriptase gene by the introduction of a new restriction enzyme site for the PCR-RFLP Assay. *Ann Clin Lab Sci.* 2017;47(5):546–550
4. Sharifiyazdi H, Mirzaei A, Ghanaatian Z. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2018;188:45–50. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.11.006
5. Ningombam SS, Chhungi V, Newmei MK, et al. Differential distribution and association of FTO rs9939609 gene polymorphism with obesity: A cross-sectional study among two tribal populations of India with East-Asian ancestry. *Gene.* 2018;647:198–204. doi: 10.1016/j.gene.2018.01.009
6. Katsnelson BA, Minigaliyeva IA, Panov VG, et al. Some patterns of metallic nanoparticles' combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles. *Food Chem Toxicol.* 2015;86:351–64. doi: 10.1016/j.fct.2015.11.012
7. Wang B, Feng WY, Wang TC, et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett.* 2006;161(2):115–123. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.08.007
8. Cho WS, Duffin R, Howie S, et al. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn2+ dissolution inside lysosomes. *Part Fibre Toxicol.* 2011;8:27. doi: 10.1186/1743-8977-8-27
9. Adamcakova-Dodd A, Stebounova LV, Kim JS, et al. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using sub-acute and sub-chronic murine inhalation models. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:15. doi: 10.1186/1743-8977-11-15
10. Filippi C, Pryde A, Cowan P, et al. Toxicology of ZnO and TiO₂ nanoparticles on hepatocytes: impact on metabolism and bioenergetics. *Nanotoxicology.* 2015;9(1):126–34. doi: 10.3109/17435390.2014.895437
11. Choi J, Kim H, Kim P, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in rats treated by two different routes: single intravenous injection and single oral administration. *J Toxicol Environ Health.* 2015;78(4):226–43. doi: 10.1080/15287394.2014.949949
12. Jacobsen NR, Stoeger T, van den Brule S, et al. Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories. *Food Chem Toxicol.* 2015;85:84–95. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.008
13. Gao F, Ma N, Zhou H, et al. Zinc oxide nanoparticles-induced epigenetic change and G2/M arrest are associated with apoptosis in human epidermal keratinocytes. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3859–74. doi: 10.2147/IJN.S107021
14. Wei Y, Li Y, Jia J, Jiang Y, et al. Aggravated hepatotoxicity occurs in aged mice but not in young mice after oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *NanoImpact.* 2016;3–4:1–11. doi: 10.1016/j.impact.2016.09.003
15. Ng CT, Yong LQ, Hande MP, et al. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:1621–1637. doi: 10.2147/IJN.S124403
16. Chen Z, Meng H, Xing G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett.* 2006;163(2):109–20. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.10.003
17. Karlsson H, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(9):1726–32. doi: 10.1021/tx800064j
18. Studer AM, Limbach LK, Van Duc L, et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2010;197(3):169–74. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.05.012
19. Bondarenko O, Ivask A, Käkinen A, Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ Pollut.* 2012;169:81–9. doi: 10.1016/j.envpol.2012.05.009
20. Magaye R, Zhao J, Bowman L, Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Exp Ther Med.* 2012;4(4):551–561. doi: 10.3892/etm.2012.656
21. Pang C, Selck H, Misra SK, et al. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: a comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat Toxicol.* 2012;106–107:114–22. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.10.005
22. Akhtar MJ, Kumar S, Alhadlaq HA, Alrokayan SA, Abu-Salah KM, Ahamed M. Dose-dependent genotoxicity of copper oxide nanoparticles stimulated by reactive oxygen species in human lung epithelial cells. *Toxicol Ind Health.* 2013;32(5):809–21. doi: 10.1177/0748233713511512
23. Alarifi S, Ali D, Verma A, Alakhtani S, Ali BA. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *Int J Toxicol.* 2013;32(4):296–307. doi: 10.1177/1091581813487563
24. Cuillel M, Chevallet M, Charbonnier P, et al. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions. *Nanoscale.* 2014;6(3):1707–15. doi: 10.1039/c3nr05041f
25. Gomes T, Araújo O, Pereira R, Almeida AC, Cravo A, Bebianno MJ. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res.* 2013;84:51–9. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.11.009
26. Xu J, Li Z, Xu P, Xiao L, Yang Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch Toxicol.* 2013;87(6):1067–73. doi: 10.1007/s00204-012-0925-0
27. Privalova LI, Katsnelson BA, Loginova NV, et al. Some characteristics of free cell population in the airways of rats after intratracheal instillation of copper-containing nanoscale particles. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):21538–53. doi: 10.3390/ijms151121538
28. Privalova LI, Katsnelson BA, Loginova NV, et al. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12379–406. doi: 10.3390/ijms150712379
29. Li Y, Zheng Y, Qian J, et al. Preventive effects of zinc against psychological stress-induced iron dyshomeostasis, erythropoiesis inhibition, and oxidative stress status in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2012;147(1–3):285–91. doi: 10.1007/s12011-011-9319-z
30. Varaksin AN, Katsnelson BA, Panov VG, et al. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead. *Food Chem Toxicol.* 2014;64:144–56. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.024
31. Panov VG, Katsnelson BA, Varaksin AN, et al. Further development of mathematical description for combined toxicity: A case study of lead–fluoride combination. *Toxicol Rep.* 2015;2:297–307. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.02.002
32. Katsnelson BA, Minigaliyeva IA, Panov VG, et al. Some patterns of metallic nanoparticles' combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles. *Food Chem Toxicol.* 2015;86:351–64. doi: 10.1016/j.fct.2015.11.012
33. Katsnelson BA, Tsepilov NA, Panov VG, et al. Applying theoretical premises of binary toxicity mathematical modeling to combined impacts of chemical plus physical agents (A case study of moderate subchronic exposures to fluoride and static magnetic field). *Food Chem Toxicol.* 2016;95:110–20. doi: 10.1016/j.fct.2016.06.024
34. Minigalieva IA, Katsnelson BA, Panov VG, et al. Experimental study and mathematical modeling of toxic metals combined action as a scientific foundation for occupational and environmental health risk assessment. A summary of results obtained by the Ekaterinburg research team (Russia). *Toxicol Rep.* 2017;4:194–201. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.04.002
35. Bremner I, Beattie JH. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc.* 1995;54(2):489–99. doi: 10.1079/PNS19950017