

На правах рукописи



РЯБОВА
Юлия Владимировна

**ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА
СЕЛЕНА ИЗОЛИРОВАННО И В КОМБИНАЦИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ
ОКСИДА МЕДИ**

3.2.1. Гигиена

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Екатеринбургском медицинском - научном центре профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель
доктор медицинских наук

Сутункова Марина Петровна

Официальные оппоненты:

Скупневский Сергей Валерьевич – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биомедицинских исследований» Владикавказского научного центра Российской академии наук, заведующий отделом биомедицинских технологий.

Фатхутдинова Лилия Минвагизовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой гигиены, медицины труда.

Ведущая организация

Федеральное бюджетное учреждение науки «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека».

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.0.055.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук, созданного на базе ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620014, г. Екатеринбург, ул. Попова, д. 30.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора по адресу: 620014, г. Екатеринбург, ул. Попова, д. 30, на сайте <https://www.umrc.ru>, а также на сайте ВАК при Минобрнауки России: vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 99.0.055.02,
кандидат медицинских наук, доцент



Адриановский
Вадим Иннович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Селен и его соединения активно используются в хозяйственной деятельности, что подтверждается высокими мировыми объемами его добычи – 80-90 тысяч тонн в составе медных месторождений, которые являются основным источником селена (Лебедь и др., 2015).

Потенциальные и фактические риски для здоровья человека связаны с высокими объемами добычи селена и широким его применением. Некоторые производственные процессы связаны с образованием элементооксидных (ЭО) наночастиц (НЧ), которые наряду с субмикронными частицами размером более 100 нм загрязняют рабочее место и окружающий воздух (ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании). Литературные данные, полученные из открытых источников, свидетельствуют о том, что ЭО НЧ обладают при равном химическом составе более выраженным вредным действием на организм, чем частицы микрометрового диапазона либо ионы (Cho et al., 2012; Cronholm et al., 2013; Кацнельсон и др., 2015, 2016; Kondaparthi et al., 2019).

Профессиональный контакт с селеном и его соединениями, включая их НЧ, встречается в металлургии – при переработке медных шламов, обжиге медного колчедана, производстве марганца, селена и теллура. Его используют для придания литой стали мелкозернистой структуры, улучшения механических свойств нержавеющей сталей. Селен применяют в стекольном производстве для обесцвечивания зелёного стекла и получения рубиновых стёкол, в производстве керамики, в резиновой и химической промышленности. Предполагается, что в дальнейшем сфера возможного контакта с селенсодержащими НЧ будет только расширяться в связи с использованием их в современных наукоемких областях, таких как электроника и оптоэлектроника.

Контакт человека с селенсодержащими НЧ может произойти в результате загрязнения ими окружающей среды либо ввиду целенаправленного их

применения, а не ограничивается лишь производственной деятельностью. Предприятия медеплавильной промышленности являются мощными источниками поступления во внешнюю среду аэрозолей сложного состава, которые включают, в том числе, соединения селена. Кроме того, практикуется целенаправленное применение специально синтезированных селенсодержащих НЧ с заданными свойствами для нужд медицины и курортологии, науки, сельского хозяйства. При этом чаще учитывается положительное действие селенсодержащих НЧ, но не токсическое.

Принимая во внимание широкое применение селенсодержащих НЧ, а также недостаточность данных об особенностях действия селенсодержащих НЧ для организма человека настоящее диссертационное исследование представляется актуальным.

Необходимо более глубокое изучение токсичности и потенциальной опасности селенсодержащих НЧ при различных путях поступления для разработки эффективных мер профилактики возможного негативного воздействия.

Цель исследования: токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наночастиц оксида селена при изолированной экспозиции и в комбинации с наночастицами оксида меди в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Провести статистический анализ данных производственного контроля уровня содержания селена в воздухе рабочей зоны селенового отделения медеплавильного предприятия.

2. Исследовать реакцию глубоких дыхательных путей в ответ на однократное интратрахеальное введение наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди, а также установить тип комбинированного действия этой смеси с применением метода математического моделирования.

3. Изучить влияние наночастиц оксида селена на биоэнергетические процессы в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

4. Исследовать воздействие на состояние печени, почек, сердечно-

сосудистой системы наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди в субхроническом эксперименте *in vivo*, а также установить тип комбинированного действия этой смеси с применением метода математического моделирования.

5. Экспериментально оценить эффективность теоретически обоснованного комплекса биопротекторов, способствующих снижению химических рисков производственной среды для здоровья рабочих, связанных с воздействием наночастиц оксидов селена и меди.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования. Проведенные эксперименты *in vivo* и *in vitro* позволили установить, что наночастицы оксида селена обладают способностью снижать биоэнергетический потенциал клеток. В экспериментах *in vivo* установлено, что ведущим типом комбинированного токсического действия наночастиц оксида селена и наночастиц оксида меди является потенцирование при острой экспозиции и аддитивность при субхронической. Научно обоснованы эффективность и безопасность комплекса биопротекторов, способствующих снижению химических рисков производственной и окружающей среды за счет повышения резистентности организма к действию наночастиц оксидов селена и меди.

Методология и методы исследования. Для достижения поставленных цели и задач применились методы токсиколого-гигиенической оценки в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, статистические методы обработки данных.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Установлено, что однократное интратрахеальное введение наночастиц оксида селена в эксперименте *in vivo* вызывает приток общей клеточности и рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов. При комбинированном воздействии наночастиц оксида селена и меди наблюдается выраженная реакция глубоких дыхательных путей. Методами математического моделирования установлено, что ведущим типом острого комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди является потенцирование.

2. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлена способность наночастиц

оксида селена нарушать биоэнергетические процессы клеток.

3. Доказано влияние наночастиц оксида селена в субхроническом эксперименте *in vivo* на состояние печени, почек, сердечно-сосудистой системы как изолированно, так и в комбинации с наночастицами оксида меди. Методами математического моделирования установлено, что ведущим типом субхронического комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди является аддитивность.

4. Устойчивость организма к комбинированному вредному воздействию наночастиц оксида селена и меди повышается при применении комплекса биопротекторов.

Практическая значимость работы и внедрение в практику. Результаты диссертационной работы использованы при составлении Государственного доклада Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году». Материалы диссертационной работы включены в программу образовательного процесса подготовки студентов медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (Акт внедрения от 16 февраля 2023 г.). Материалы диссертационной работы внедрены в деятельность ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора (ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора) (Акт внедрения № 01 от 25 января 2023, № 02 от 30 января 2023). Материалы диссертационной работы использованы в практической деятельности учреждений Роспотребнадзора в Свердловской области (Акт внедрения № 1 от 14.02.2023). Материалы диссертационной работы использованы в отчетной документации в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России» (Рег.№ НИОКТР 121121300181-5, Рег.№ НИОКТР 121091400188-9, Рег.№ НИОКТР 121091400189-6). На основании

материалов диссертационного исследования разработан способ повышения устойчивости организма к комбинированному цитотоксическому действию наночастиц оксидов селена и меди и получен патент РФ №2786819 от 26.12.2022 для способа минимизации химических рисков производственной и окружающей среды для здоровья.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Комплексный подход к проблеме с применением современных методов исследования, а также адекватно подобранные методы математической обработки полученных данных, обеспечивают в совокупности достоверность полученных результатов. Корректное функционирование оборудования было обеспечено в соответствии с нормативными требованиями. Во всех помещениях соблюдались требуемые параметры микроклимата. Достоверность и репрезентативность результатов испытаний обеспечивали достаточным количеством наблюдений (в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах, *in vivo* на 192 крысах) и надлежащей статистической обработкой.

Материалы исследований, отражающие результаты диссертационной работы, доложены и обсуждены на 6 конференциях и форумах: II Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения» 20-21 октября 2021 г., г. Екатеринбург, Российская Федерация; XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», 21-24 июня 2022 г., оздоровительный комплекс «Лужки», Московская область, Российская Федерация; 4-ого Международного молодежного форума «ПРОФЕССИЯ и ЗДОРОВЬЕ», 5-7 июля 2022 г., г. Светлогорск, Российская Федерация; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Взаимодействие науки и практики. Опыт и перспективы», 6-7 октября 2022 г., г. Екатеринбург, Российская Федерация; Международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда», посвященной 95-летию республиканского унитарного предприятия

«Научно-практический центр гигиены», 24-25 ноября 2022 г., г. Минск, Республика Беларусь; Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы промышленной токсикологии и экологии», посвященной 100-летию со дня рождения выдающегося отечественного промышленного токсиколога, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента Российской Академии медицинских наук И.В. Саноцкого, 7 декабря 2022 года, г. Москва, Российская Федерация.

Личный вклад автора. Автором организованы и проведены экспериментальные исследования *in vivo*, принято участие в экспериментах *in vitro*. Выполнен статистический анализ полученных данных. Обработаны данные производственного контроля содержания селена в воздухе рабочей зоны медеплавильного предприятия. Интерпретированы результаты, сформулированы выводы и практические рекомендации. Автором подготовлены публикации по результатам проведенных исследований. Личный вклад автора по всем разделам работы составляет не менее 85%.

Публикации. По материалам диссертационного исследования было опубликовано 10 научных работ (в том числе 7 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства высшего образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертационных работ).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 135 страницах. Содержит введение, 5 глав, заключение, выводы, список сокращений, а также список литературы. Список литературы включает 222 источника, из которых 168 иностранных. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 23 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна и практическая значимость; определены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по теме исследования.

Во второй главе представлен дизайн исследований, описаны используемые материалы и методы.

Суспензии НЧ оксида селена (SeO) и НЧ оксида меди (CuO) для экспериментальных исследований были получены в Уральском Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» методом лазерной абляции листовых мишеней из соответствующих элементов (медь, селен) 99.99 % чистоты под слоем стерильной деионизированной воды.

Моделирование интоксикации в экспериментальном исследовании *in vitro* было выполнено на клеточной культуре линии ФЛЭЧ-104, которая является монослойной культурой фибробластоподобных клеток, полученных из лёгких 8-недельного эмбриона человека (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург, Россия). Содержание АТФ в культуре определялось по люминесцентному сигналу с использованием реагентов Cell Titer-Glo (Promega Corporation, США). Митохондриальную функцию клеток оценивали с помощью набора для проведения клеточного МТТ-теста (Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Technologies, США, Калифорния).

Исследования на животных были одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (протокол №2 от 20.04.2021 г.). Животные содержались в условиях специально организованного и оборудованного вивария на базе ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Экспериментальное исследование с использованием лабораторных животных проводилось с учетом Хельсинской декларации и “International guiding principles for biomedical research involving animals”, разработанными the Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012).

Экспериментальные исследования проводились на 192 аутбредных белых крысах в возрасте около 4 месяцев (таблица 1).

Таблица 1 – Дизайн проведенных экспериментов *in vivo*

Вариант эксперимента	Группы животных	Число жив.	Сумм. доза ЭО НЧ, мг/кг м.т.	Длит. эксп.	Способ введ.
Острая интоксикация	Контроль интактный	10	0	24 часа (1 введение ЭО НЧ)	Интра трахеально
	НЧ SeO	10	1,25		
	НЧ CuO	10	1,25		
	НЧ SeO + НЧ CuO	10	0,625 + 0,625		
	НЧ SeO + НЧ CuO + БПК*	10	0,625 + 0,625		
	Контроль после БПК*	10	0		
Субхроническая интоксикация	Контроль интактный	12	0	6 недель (18 введений ЭО НЧ)	Внутрибрюшинно
	НЧ SeO 0,01	12	3,6		
	НЧ SeO 0,5	12	18		
	НЧ SeO 1	12	36		
	НЧ CuO 0,5	12	18		
	НЧ CuO 1	12	36		
	НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 0,5	12	18 + 18		
	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5	12	36 + 18		
	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 1	12	36 + 36		
	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 1 + БПК*	12	36 + 36		
	Контроль после БПК*	12	0		
Примечание: значком «*» отмечен БПК – биопротифилактический комплекс					

Крысы делились на группы (по 10 крыс-самок (средняя масса составила $222,43 \pm 1,48$ г, и не превышала $\pm 20\%$ от средней массы всех животных) для острого эксперимента и по 12 крыс-самцов (средняя масса составила $232,65 \pm 1,13$ г, и не превышала $\pm 20\%$ от средней массы всех животных) для субхронического эксперимента. Каждая крыса получала групповую и индивидуальную метки.

Острую интоксикацию моделировали при помощи интра трахеального введения водных суспензий НЧ ЭО. Реакцию глубоких дыхательных путей оценивали через 24 часа, определяя цитологические и биохимические характеристики бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ).

Субхроническая модель интоксикации была реализована путем внутрибрюшинных инъекций исследуемых веществ (раздельно либо комбинированно) 3 раза в неделю в течение 6 недель. Для подбора доз перед

планированием основного был проведен «пилотный» эксперимент. Для оценки степени интоксикации в конце экспозиционного периода исследовано свыше 50 физиологических, цитологических, биохимических, гистоморфологических показателей состояния организма контрольных и подопытных животных, в том числе проводился метаболомный скрининг крови с использованием ВЭЖХ-МС, оценивалась ультраструктура клеток с использованием электронного микроскопа в режиме STEM, проводилась оценка тканевых мазков-отпечатков. Оценка соотношения митохондрий разных типов проводилась в соответствии с классификациями, предложенной Mei G. Sun и соавт. (2007). В середине 5-й недели эксперимента оценивали состояние сердечно-сосудистой системы с помощью неинвазивной регистрации электрокардиограммы и параметров артериального давления с использованием систем ecgTUNNEL (emka TECHNOLOGIES, Париж, Франция) и CODA-HT8 (Kent Scientific, Торрингтон, США) соответственно.

Часть животных в проведенных экспериментах получали *per os* БПК, в состав которого входили следующие компоненты. Энтеросорбент – яблочный пектин (ООО «Промавтоматика», г. Белгород, Россия) добавляли к части корма крыс в количестве, соответствующем дозе 200 мг на крысу. Крысы получали глутамат (АО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, Россия) в виде 1,5% раствора вместо питьевой воды *ad libitum*. Препараты, включая витамины и минералы – Глицин (ООО «Биотики», г. Москва, Россия), Аскорутин (Витамин С и Рутин; ООО «Марбиофарм», Йошкар-Ола, Россия), Аквадетрим (Витамин D₃ – холекальциферол; АО «Акрихин», г. Старая Купавна, Россия), Витамин B₁₂ (цианкоболамин; «Solgar Inc.», Leonia, New Jersey, USA) – доступные в виде таблеток, были измельчены и добавлены к другой порции корма в количествах, соответствующих рекомендуемой суточной дозе этих микроэлементов для крыс (там, где такие рекомендации были известны только для людей, пересчет потребности для крыс был сделан на основе межвидового соотношения метаболизма). Использовался препарат рыбьего жира «Янтарная капля» (смесь ω-3 полиненасыщенных жирных кислот с преобладанием докозагексаеновой, не менее 45 %, и эйкозапентаеновой кислоты, не менее 40 %; ООО «Экко плюс», г. Жуковский, Россия).

Статистическая значимость межгрупповых различий средних значений всех полученных показателей оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой на множественные сравнения. Различия считались статистически значимыми при уровне случайности $p < 0,05$. Математическое описание комбинированной токсичности было выполнено с использованием методологии построения поверхности отклика (the Response Surface Methodology – RSM), обобщающей методы ANOVA и математической теории организации эксперимента. Для определения типа зависимости доза-реакция экспериментальные данные для конкретного показателя были аппроксимированы соответствующим функциональным выражением.

Информация об условиях труда рабочих медеплавильного предприятия получена по данным производственного контроля, осуществляемого предприятием в соответствии с требованиями СП 1.1.1058-01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением Санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и СП 2.2.3670-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда» в период с 2019 по 2021 год силами собственной аккредитованной лаборатории и испытательно-лабораторного центра ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области». Статистическая обработка полученных данных и построение графиков осуществлялась диссертантом самостоятельно с использованием методов статистического анализа в пакетах прикладных программ Ms Excel 2016.

В третьей главе представлен анализ данных производственного контроля уровня содержания селена в воздухе рабочей зоны медеплавильного предприятия, согласно которому работники селенового отделения (профессия – аппаратчик в производстве редких металлов) подвергаются воздействию аэрозолей сложного состава, содержащей селен (среднесменная концентрация составляет $2,51 \pm 0,09$ мг/м³, что согласно ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны» превышает уровень ПДК на 25,5%).

Согласно Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 «Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании гарант» к источникам наноаэрозолей в производственной среде относятся все высокотемпературные процессы (рафинирование и обработка, горение), некоторые процессы механической обработки материалов (высокоскоростное измельчение и обработка). Как показано ранее, присутствие в воздухе рабочей зоны частиц менее 100 нм наряду с субмикронными частицами более 100 нм характерно и для медеплавильного производства, а соотношение атома металла и кислорода было близким к 1:1, что свидетельствует в пользу присутствия ЭО НЧ (Привалова и др., 2014; Privalova et al., 2014; Рузаков и др., 2021).

В четвертой главе описаны результаты, полученные в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

В результате однократного интратрахеального введения НЧ оксида селена *in vivo* вызывают приток общей клеточности и рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов (АМ), но не нейтрофильных лимфоцитов (НЛ). При воздействии НЧ оксида селена изолировано не изменился биохимический состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) (таблица 2).

При комбинированном воздействии НЧ SeO и НЧ CuO вызывают выраженную реакцию глубоких дыхательных путей, которая проявляется изменением цитологических (приток общей клеточности, увеличение абсолютного содержания НЛ и АМ, рост их соотношения, увеличение фагоцитарной активности НЛ) и биохимических показателей (не изменялась активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), но повышалась активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), амилазы) состава БАЛЖ (таблица 2).

Таблица 2 — Цитологические и биохимические показатели надосадочной жидкости БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии НЧ оксидов селена, меди либо их комбинации ($\bar{X} \pm Sx$)

Показатель		Группа крыс, получавших			
		ДВ	НЧ SeO	НЧ CuO	НЧ SeO + НЧ CuO
Цитологические показатели					
Число клеток, $\times 10^6$	Общее	3,62 \pm 0,35	5,35 \pm 0,72 *	5,29 \pm 0,84	15,97 \pm 3,88 **@
	НЛ	0,68 \pm 0,11	1,30 \pm 0,26	2,03 \pm 0,31*	10,24 \pm 2,72 **@
	АМ	2,57 \pm 0,19	3,11 \pm 0,1	3,01 \pm 0,72	4,93 \pm 1,23
Отношение НЛ/АМ		0,26 \pm 0,04	0,53 \pm 0,13	0,55 \pm 0,09 *	2,16 \pm 0,43 **@
Биохимические показатели					
АлАТ, Ед/л		1,98 \pm 0,28	1,83 \pm 0,18	2,73 \pm 0,25**	3,01 \pm 0,34 **
АсАТ, Ед/л		11,18 \pm 1,51	8,67 \pm 1,54	2,97 \pm 0,48	44,10 \pm 17,05 **@
Амилаза, Ед/л		2,63 \pm 0,06	3,24 \pm 0,64	15,25 \pm 1,11**	26,10 \pm 5,07 **
ГГТП, Ед/л		1,57 \pm 0,36	5,18 \pm 2,01	1,66 \pm 0,20	3,55 \pm 1,04
ЛДГ, Ед/л		34,29 \pm 2,10	25,56 \pm 5,31	46,38 \pm 3,25 **	84,56 \pm 20,88 **
Показатели фагоцитоза НЛ и АМ					
Активность фагоцитоза, % клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа	АМ	10,60 \pm 0,60	20,63 \pm 2,73 *	11,67 \pm 1,03 #	11,60 \pm 1,44 #
	НЛ	9,40 \pm 0,40	13,80 \pm 2,15	10,40 \pm 0,51	21,20 \pm 0,49 **@
Индекс фагоцитоза, среднее число частиц латекса, поглощенных одной клеткой	АМ	1,19 \pm 0,08	2,04 \pm 0,30 *	1,11 \pm 0,04 #	1,24 \pm 0,09
	НЛ	1,06 \pm 0,02	1,50 \pm 0,25	1,10 \pm 0,00	2,08 \pm 0,06 **@
НСТ-тест, % восст. фагоцитом гранул НСТ в нерастворимый диформаган		1,43 \pm 0,20	1,50 \pm 0,19	2,67 \pm 0,65	3,00 \pm 0,67
Примечание: Статистически значимое отличие * - от контрольной группы, # - от группы НЧ SeO, @ - от группы НЧ CuO ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента)					

Цитотоксическое действие при комбинированном воздействии НЧ оксида селена и НЧ оксида меди представляется следующим образом (рисунок 1).

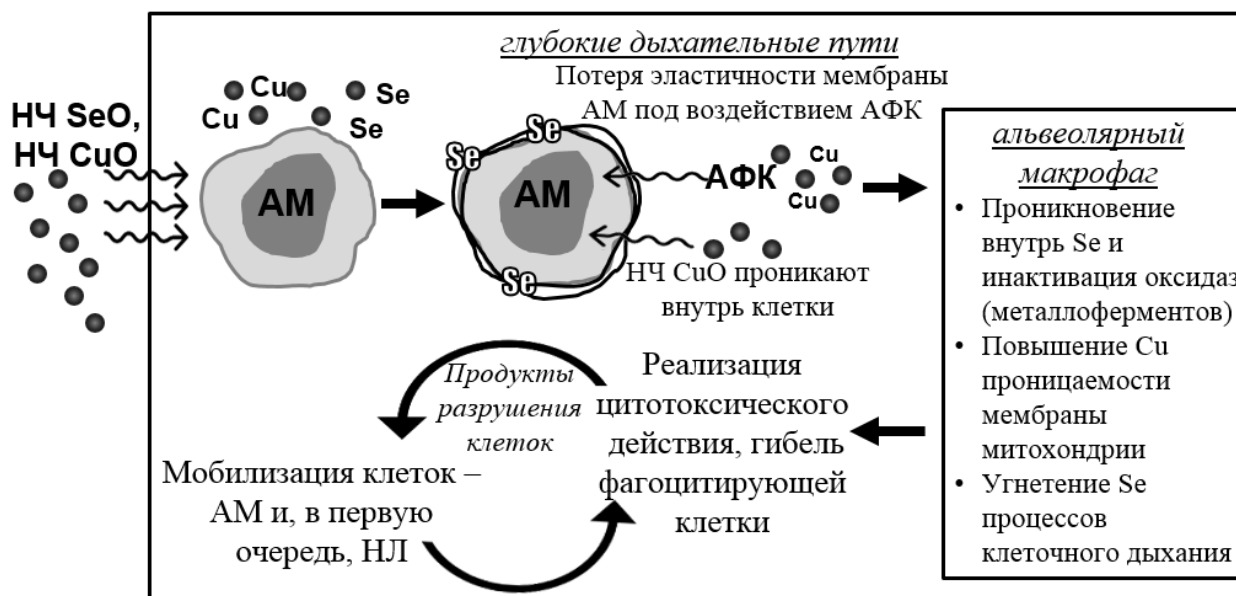


Рисунок 1 – Предполагаемый механизм комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди при интратрахеальном поступлении

Методами математического моделирования установлено, что комбинированное острое действие НЧ оксидов селена и НЧ оксидов меди имеет преимущественно потенцирующий характер (рисунок 2).

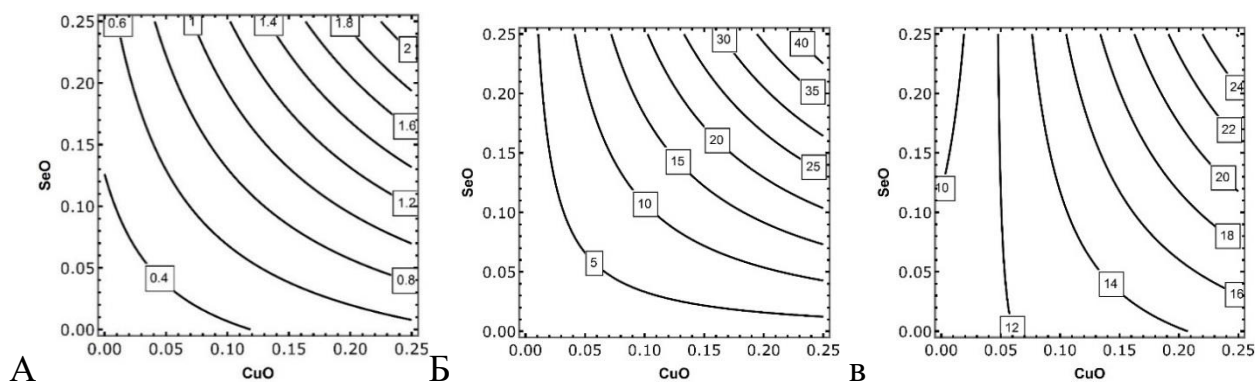


Рисунок 2 – Пример изоболограммы, иллюстрирующей характер типа комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO на: (А) соотношение НЛ/АМ: потенцирование на низких дозах НЧ, переходящее в аддитивность на высоких; (Б) активность амилазы: потенцирование на низких дозах НЧ, переходящее в аддитивность на высоких, Ед/л; (В): активность АсАТ: однофакторное действие НЧ CuO на низких дозах меди, переходящее в аддитивное при высоких дозах НЧ, Ед/л. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта

Установлена способность наночастиц оксида селена в условиях экспериментов *in vitro* нарушать биоэнергетические процессы клеток, о чем судили по снижению АТФ-зависимой люминесценции и скорости потребления кислорода клетками в монослойной культуре фибробластоподобных клеток (рисунок 3).

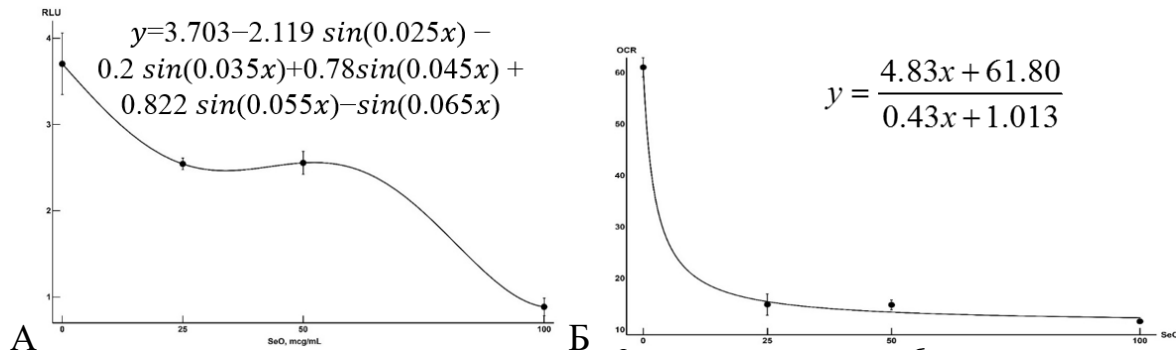


Рисунок 3 – Нарушение биоэнергетические процессы клеток в условиях эксперимента *in vitro* при воздействии различных доз НЧ SeO, оцененное по снижению: (А) АТФ-зависимой люминесценции, RLU; (Б) скорости потребления кислорода в культуре клеток, OCR, pmol O₂/min. По оси абсцисс отложены действующие концентрации наночастиц в инкубационной среде, мкг/мл; по оси ординат отложены значения. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего. Уравнение аппроксимирующей кривой приведено над соответствующей кривой

Изменение параметров, прямо или косвенно выявляющих нарушение биоэнергетических процессов в клетках, было установлено и в эксперименте *in vivo* по снижению активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови ($484,00 \pm 7,14\%$ в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с $575,78 \pm 6,10\%$ в группе «Контроль», $p < 0,05$), по снижению числа нормальных и нормально-везикулярных митохондрий в клетках печени (типа А и В по Mei G. Sun и соавт. (2007), $87,44 \pm 1,14\%$ в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с $94,82 \pm 0,95\%$ в группе «Контроль», $p < 0,05$), по изменению параметров метаболомного профиля сыворотке крови с увеличением содержания ацилкарнитинов и их производных.

Доказано влияние наночастиц оксида селена в субхроническом эксперименте *in vivo* как изолированно, так и в комбинации с наночастицами оксида меди на состояние печени. Увеличилось соотношение дегенеративно изменённых гепатоцитов ($12,33 \pm 0,76\%$ в группе «НЧ SeO 0,5» и $11,00 \pm 0,73\%$ в группе «НЧ

SeO 1» в сравнении с $5,33 \pm 0,42\%$ в группе «Контроль», $p < 0,05$), число безъядерных гепатоцитов ($27,60 \pm 1,46$ клеток в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с $8,90 \pm 0,56$ в группе «Контроль», $p < 0,05$) и купферовских клеток ($20,50 \pm 0,71$ клеток в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с $11,50 \pm 0,58$ в группе «Контроль», $p < 0,05$). Активность АЛАТ, в сыворотке крови увеличилась в группе «НЧ SeO 0,1» ($56,64 \pm 3,47$ Ед/л в сравнении с $42,96 \pm 2,55$ Ед/л в группе «Контроль», $p < 0,05$). По данным метаболомного исследования сыворотки крови снизилась интенсивность аналитического сигнала для гликохолевой кислоты и липидов, фосфолипидов, лизофосфолипидов, лизофосфатидилхолинов, $p < 0,05$. Последнее согласуется с литературными данными о возможности селена, в том числе в форме НЧ, влиять на синтез липидов (He et al, 2014; Zhao et al., 2016).

При морфологическом исследовании почек отмечено увеличение числа дегенеративных клеток в проксимальных канальцах в группе «НЧ SeO 0,5» ($16,33 \pm 0,92\%$), и группе «НЧ SeO 1» ($17,33 \pm 0,99\%$) по сравнению с группой «Контроль» ($6,33 \pm 0,49\%$, $p < 0,05$). Увеличение количества дегенеративных клеток наблюдалось также в дистальных канальцах почки – в группе «НЧ SeO 0,1» ($5,67 \pm 0,56\%$), в группе «НЧ SeO 0,5» ($7,00 \pm 0,37\%$) в группе «НЧ SeO 1» ($6,83 \pm 0,48\%$) по сравнению с группой «Контроль» ($5,00 \pm 0,58\%$, $p < 0,05$). Выражена потеря щеточной каемки канальцевого эпителия почки ($17,39 \pm 1,64$ клеток в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с $5,34 \pm 0,65$ в группе «Контроль», $p < 0,05$). Изменена гистологическая картина почек.

Обнаружены изменения в работе сердечно-сосудистой системы. Под воздействием НЧ SeO у животных в группе «НЧ SeO 0,1» статистически значимо снижалось систолическое артериальное давление (АД) до $129,25 \pm 3,26$ мм. рт. ст., по сравнению с группой «Контроль» ($138,83 \pm 1,10$ мм. рт. ст., $p < 0,05$). Диастолическое АД так же было снижено в группе «НЧ SeO 0,1» до $88,92 \pm 1,92$ мм. рт. ст. в сравнении с группой «Контроль» - $100,20 \pm 3,01$ ($p < 0,05$). В группах, «НЧ SeO 0,5» и «НЧ SeO 1» значение АД не имело значимых различий с группой «Контроль». Полученный результат впервые демонстрирует неоднозначное влияние селена в форме НЧ на параметры АД, что согласуется с литературными

данными о влиянии селена в солевой форме (Wells, et al., 2012; Vulka et al., 2019; Vinceti et al., 2019) и двойственной его ролью как микроэлемента, который, тем не менее, является токсикантом. Наблюдались изменения параметров электрокардиограммы. В группе «НЧ SeO 1» снижалась частота сердечных сокращений ($382,14 \pm 18,24$ уд/мин) в сравнении с группой «Контроль» ($433,82 \pm 6,36$ уд/мин, $p < 0,05$), увеличивался обратно пропорционально интервал RR ($159,65 \pm 7,58$ мс в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с $138,98 \pm 2,06$ мс в группе «Контроль», $p < 0,05$). Снизилась амплитуда зубца Т во II отведении в группе «НЧ SeO 1» ($0,139 \pm 0,011$ мВ) в сравнении с группой «Контроль» ($0,186 \pm 0,014$ мВ в $p < 0,05$). При ультраструктурной оценке ткани левого желудочка сердца не было обнаружено изменения процентного соотношения митохондрий разных типов, оцененных по методике, предложенной Mei G. Sun и соавт. (2007).

Методами математического моделирования установлено, что ведущим типом субхронического комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди является аддитивность (рисунок 4).

Наряду с этим показано положительное действие этой же экспозиции наночастиц оксида селена, главным образом по снижению коэффициента фрагментации геномной ДНК на 2,4%, $p < 0,05$.

В пятой главе теоретически обоснован и экспериментально оценен комплекс биопротекторов. О повышении резистентности организма к вредному комбинированному действию наночастиц оксида селена и меди свидетельствуют следующие изменения. Снижался приток общей клеточности ($6,04 \pm 0,17$ клеток в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК» в сравнении с $15,97 \pm 3,88$ клеток в группе «НЧ SeO + НЧ CuO», $p < 0,05$) и нейтрофильных лейкоцитов ($2,84 \pm 0,30$ клеток в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК» в сравнении с $10,24 \pm 2,72$ клеток в группе «НЧ SeO + НЧ CuO», $p < 0,05$). Изменялось соотношение нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов ($1,04 \pm 0,13$ в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК» в сравнении с $2,16 \pm 0,43$ в группе «НЧ SeO + НЧ CuO», $p < 0,05$) в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Наблюдалась нормализация активности ферментов в надосадочной жидкости БАЛ до контрольных значений – АлАТ, АсАТ, ЛДГ.

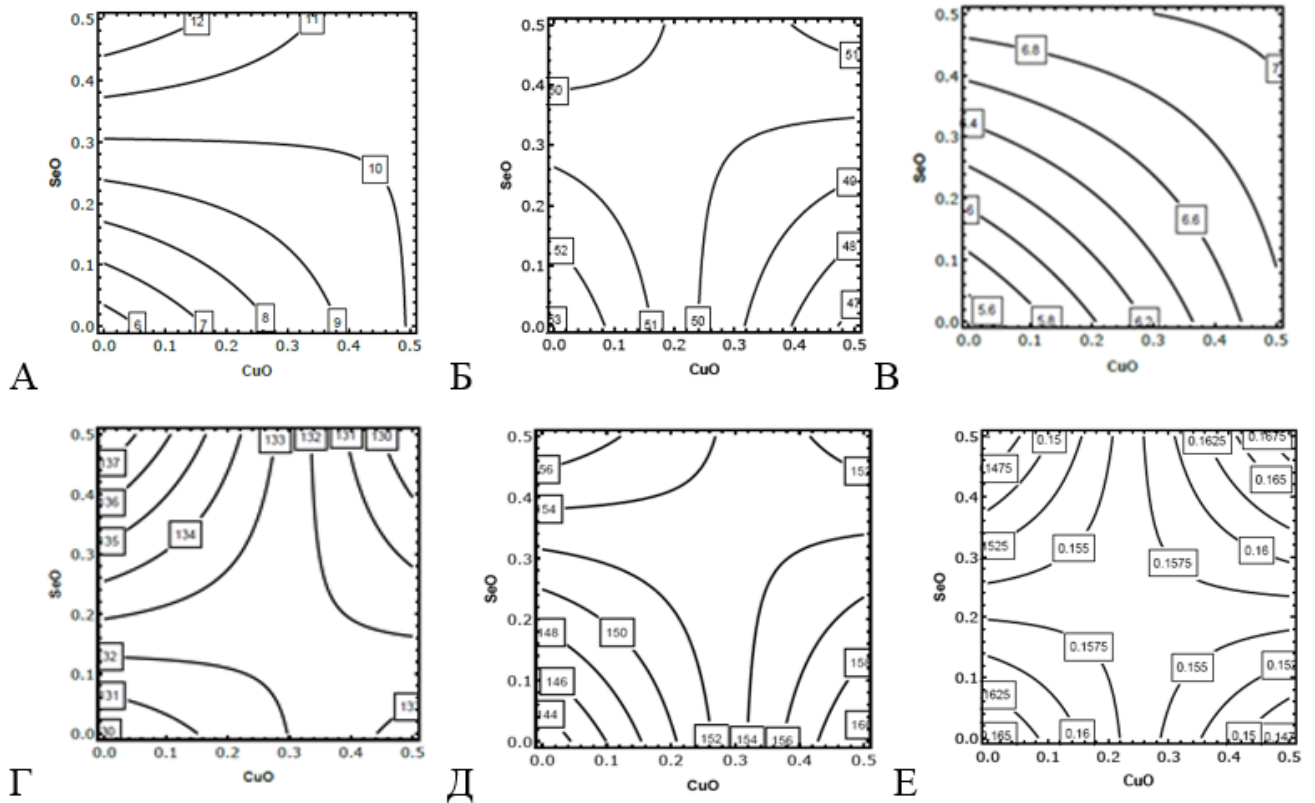


Рисунок 4 – Примеры изоболограмм, иллюстрирующие тип комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO на: (А) число дегенеративноизмененных гепатоцитов в мазках-отпечатках печени: от аддитивности на низких дозах НЧ до явного антагонизма при сочетании низких доз НЧ CuO и высоких доз НЧ SeO и преимущественно однофакторного действия НЧ CuO при сочетании высоких доз НЧ CuO с низкими дозами НЧ SeO; (Б) изменение активности АлАТ в сыворотке крови: от аддитивности на низких дозах НЧ через явный антагонизм при сочетании низких доз одних НЧ и высоких доз других НЧ до небольшого потенцирования при сочетании высоких доз НЧ; (В) число дегенеративных клеток канальцев в мазках-отпечатках дистальных канальцев почек: аддитивность, переходящая в скрытый антагонизм при увеличении доз НЧ; (Г) систолическое АД: скрытый антагонизм на низких дозах НЧ через явный антагонизм при сочетании высоких доз одних НЧ и низких доз других НЧ и потенцирование, переходящее в аддитивность на высоких дозах НЧ; Д) на интервал RR во II отведении: сложная картина типов комбинированного действия от аддитивности при низких дозах НЧ через антагонизм при росте доз до аддитивности при высоких дозах НЧ; (Е) на амплитуду зубца Т во II отведении: сложная картина типов комбинированного действия от аддитивности при низких дозах НЧ через антагонизм при росте доз до потенцирования, переходящего в аддитивность при высоких дозах НЧ. На осях дозы соответствующих ЭО-НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта.

ВЫВОДЫ

1. Статистический анализ данных производственного контроля уровня содержания селена показал, что аппаратчики в производстве редких металлов селенового отделения медеплавильного предприятия подвергаются воздействию аэрозолей сложного состава, содержащих селен, превышающий среднесменный уровень ПДК на 25,5%.

2. В результате однократного интратрахеального введения наночастицы оксида селена *in vivo* вызывают приток общей клеточности на 48%, $p < 0,05$, рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов в 2 раза, $p < 0,05$. При комбинированном воздействии наночастицы оксида селена и наночастицы оксида меди вызывают приток общей клеточности в 3,4 раза, $p < 0,05$; изменение абсолютного содержания нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов – в 14 и 2 раза соответственно, $p < 0,05$, их соотношения – в 7,3 раза, $p < 0,05$, и фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов – в 2 раза, $p < 0,05$; изменения биохимического состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа с увеличением содержания ферментов в ней. Методами математического моделирования установлено, что комбинированное острое действие наночастиц оксидов селена и меди имеет потенцирующий характер.

3. В условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo* установлено, что наночастицы оксида селена вызывают нарушение биоэнергетических процессов, что проявляется *in vitro* в монослойной культуре фибробластоподобных клеток снижением АТФ-зависимой люминесценции на 75%, $p < 0,05$, и скорости потребления кислорода клетками на 80%, $p < 0,05$; *in vivo* в независимом субхроническом эксперименте – снижением активности сукцинатдегидрогеназы на 16%, $p < 0,05$, снижением числа нормальных и нормально-везикулярных митохондрий в клетках печени на 7,78%, $p < 0,05$, изменением параметров метаболомного профиля в сыворотке крови с увеличением содержания ацилкарнитинов и их производных, $p < 0,05$.

4. Наночастицы оксида селена в условиях субхронического эксперимента *in vivo* нарушают функцию печени (снижение уровня гликохолевой кислоты в

сыворотке крови, $p < 0,001$; повышение уровня аланинаминотрансферазы в сыворотке крови на 30%, $p < 0,05$), изменяют гистоморфометрические (рост числа безъядерных гепатоцитов в 3,1 раза, $p < 0,05$) и цитологические (рост числа дегенеративно-измененных гепатоцитов в 2,2 раза, $p < 0,05$) характеристики органа. При комбинированном воздействии наночастиц оксидов селена и меди показан аддитивный эффект по изменению числа дегенеративно-измененных гепатоцитов, уровня аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.

5. Наночастицы оксидов селена в условиях субхронического эксперимента *in vivo* оказывают влияние на морфологические характеристики почек (увеличение потери щеточной каемки в 3,2 раза, $p < 0,05$; рост числа дегенеративных клеток проксимальных канальцев в 2,7 раза, дистальных канальцев – в 1,3 раза, $p < 0,05$). При комбинированном воздействии наночастиц оксидов селена и меди показан аддитивный эффект по этим показателям.

6. Наночастицы оксидов селена в условиях субхронического эксперимента *in vivo* оказывают влияние на состояние сердечно-сосудистой системы (снижение систолического и диастолического артериального давления на 6,5 % и на 11,3% соответственно, $p < 0,05$; снижение частоты сердечных сокращений на 11,8%, $p < 0,05$, укорочение интервала QT на 7,1 %, $p < 0,05$ и снижение амплитуды зубца T на 25,3%, $p < 0,05$). При комбинированном воздействии наночастиц оксида селена и наночастиц оксида меди показан аддитивный эффект на систолическое артериальное давление, длительность интервала RR и амплитуду зубца T.

7. Резистентность организма к вредному комбинированному действию наночастиц оксида селена и меди повышалась при применении теоретически обоснованного и экспериментально оцененного комплекса биопротекторов, который вызвал значительное снижение токсичности (снижение коэффициента НЛ/АМ в 2 раза, $p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты экспериментальной апробации биопрофилактического комплекса, повышающего устойчивость организма к вредному комбинированному

действию наночастиц оксидов селена и меди, позволяют обосновать целесообразность использования тех же биопротекторов в целях биологической профилактики хронических профессиональных и производственно обусловленных заболеваний, вызванных комбинированным воздействием селена и меди, в том числе в наноразмерной форме, в первую очередь рабочих металлургических предприятий, занятых в химико-металлургических и шламовых цехах при производстве селена из медных шламов, при производстве литой стали, нержавеющей сталей.

Учреждениям высшего профессионального образования материалы рекомендуются для внедрения в учебный процесс: использовать в лекционном курсе и на практических занятиях по дисциплинам «Гигиена труда», «Коммунальная гигиена» для студентов медико-профилактического факультета.

Контрольно-надзорным органам в области охраны труда и здоровья работников рекомендуется при оценке потенциального риска для здоровья лиц, подвергающихся комбинированному воздействию наночастиц оксида селена и меди, не ограничиваться суммированием однофакторных рисков, а учитывать необходимость дополнительного запаса надежности для сохранения здоровья в условиях токсического действия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанный биопрофилактический комплекс может быть рекомендован для дальнейших исследований в контролируемом курсе на рабочих медеплавильных предприятиях. Оценка эффективности такого курса биопрофилактики должна проводиться на основании клинико-лабораторного обследования непосредственно перед началом курса и сразу после его окончания. Дальнейшее продолжение токсиколого-гигиенических исследований (включая изучение отдаленных эффектов) может способствовать обоснованию ориентировочно безопасного уровня воздействия НЧ SeO в воздухе производственных помещений и атмосферном воздухе населенных мест. Дальнейшее изучение особенностей механизмов токсикодинамики и

токсикокинетики селенсодержащих наночастиц (на примере НЧ SeO), в том числе на молекулярном уровне, может способствовать выявлению фундаментальных механизмов действия наночастиц оксида селена. Такое действие может быть принято во внимание с целью разработки специализированного метода диагностики и включения его в комплексное клиничко-лабораторного обследование групп риска (рабочие промпредприятий и население, экспонируемое к селенсодержащим наночастицам).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Применение оттисковой цитологии в оценке иммунологических эффектов изолированного и комбинированного действия наночастиц селена и меди / Р.Р. Сахаутдинова, Ю.В. Рябова, В.Г. Панов, И. А. Минигалиева, М. П. Сутункова, Т. В. Бушуева // Гигиена и санитария. – 2021. – № 100 (12). – С. 1502-1507.

2. Различные варианты дозозависимого эффекта наночастиц оксида селена и оксида меди *in vitro* и применение парадигмы гормезиса / В.Г. Панов, И.А. Минигалиева, Т.В. Бушуева, Е.П. Артёменко, Ю.В. Рябова, М.П. Сутункова, В.Б. Гурвич, Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон // Гигиена и санитария. – 2021. – № 100 (12). – С. 1475-1480.

3. Клинова, С.В. Сравнительное и комбинированное кардиоваскулярное действие наночастиц оксидов меди и селена / С.В. Клинова, Ю.В. Рябова, А.В. Тажигулова // Сборник «Профессия и здоровье»: Материалы 4-го Международного молодёжного форума «Профессия и здоровье». – 2022. – С. 115-119.

4. Чемезов, А.И. Влияние изолированного и комбинированного действия наночастиц оксида меди и селена на метаболизм крови крыс в субхроническом эксперименте / А.И. Чемезов, Ю.В. Рябова // Сборник «Профессия и здоровье»: Материалы 4-го Международного молодёжного форума «Профессия и здоровье». – Калининград, 2022. – С. 195-198.

5. Изучение комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди в субхроническом эксперименте / Минигалиева И.А., Рябова Ю.В.,

Сутункова М.П., Гурвич В.Б., Привалова Л.И., Панов В.Г., Тажигулова А.В., Соловьева С.Н., Сутункова Ю.М., Кацнельсон Б.А. // Токсикологический вестник. – 2022. – № 30 (4). – С. 238-247.

6. **Рябова, Ю.В. Оценка токсического действия наночастиц оксида селена на организм крыс и положительный эффект биопрофилактики (экспериментальные данные) / Ю.В. Рябова, Р.Р. Сахаутдинова, А.В. Тажигулова // Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Москва, 2022. – С. 238-240.**

7. **Повышение устойчивости организма к вредному комбинированному цитотоксическому действию наночастиц оксидов селена и меди / Л. И. Привалова, Ю. В. Рябова, М. П. Сутункова, В. Б. Гурвич, И. А. Минигалиева, Т. В. Бушуева, А. В. Тажигулова, С. Н. Соловьева, Б. А. Кацнельсон // Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО. – 2022 – № 9 – С. 43-49.**

8. **Оценка влияния на биоэнергетические процессы клеток наночастиц селена как фактора химического риска производственной и окружающей среды для здоровья / Ю. В. Рябова, М. П. Сутункова, А. И. Чемезов, И. А. Минигалиева, Т. В. Бушуева, И. Г. Шеломенцев, С. В. Клинова // Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО. – 2022 – № 9 – С. 29-34.**

9. **О сочетании позитивных и негативных эффектов наночастиц оксида селена при субхронической экспозиции крыс / Рябова Ю.В., Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Сутункова М.П., Сахаутдинова Р.Р., Клинова С.В., Тажигулова А.В., Бушуева Т.В., Макеев О.Г., Кацнельсон Б.А. // Токсикологический вестник. – 2022. – Т. 30, №6. – С. 386-394.**

10. **Рябова, Ю.В. Оценка цитотоксического комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди в остром эксперименте на крысах / Ю.В. Рябова, А.В. Тажигулова // Гигиена и санитария. – 2022. – Т. 101, № 12. – С. 1588-1595.**

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АД	– артериальное давление
АЛаТ	– аланинаминотрансфераза
АМ	– альвеолярные макрофаги
АСаТ	– аспартатаминотрасфераза
АТФ	– аденозинтрифосфат
БАЛ	– бронхоальвеолярный лаваж
БАЛЖ	– бронхоальвеолярная лаважная жидкость
БПК	– биопрофилактический комплекс
ВЭЖХ-МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ГГТП	– гамма-глутамилтранспептидаза
ДВ	– деионизированная вода
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
НЛ	– нейтрофильные лейкоциты
НСТ	– нитросиний тетразолий
НЧ	– наночастицы
ПДК	– предельно допустимая концентрация
ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора	– ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора
ЧСС	– частота сердечных сокращений
ЭО	– элементооксидные
CuO	– оксид меди
RSM	– the Response Surface Methodology
SeO	– оксид селена
STEM	– scanning transmission electron microscopy

Рябова Юлия Владимировна

ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА
СЕЛЕНА ИЗОЛИРОВАННО И В КОМБИНАЦИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ
ОКСИДА МЕДИ

3.2.1. Гигиена

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета 99.0.055.02
(протокол №12 от 20.02.2023), созданного на базе ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП
Роспотребнадзора, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России

Подписано в печать 21.02.2023. Формат 60 × 84 1/16. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 60 экз. Отпечатано в типографии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП
Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, ул. Попова, 30