

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны
здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора
Управление Роспотребнадзора по Свердловской области
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Свердловской области
Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина
АНО «Уральский региональный центр экологической эпидемиологии»**

**АКТУАЛЬНЫЕ ГИГИЕНИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ НАНОТОКСИКОЛОГИИ:
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ,
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТИ
ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ И ПУТИ ЕЁ СНИЖЕНИЯ**

**Материалы Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием**

**20 – 21 октября 2016 г.
г. Екатеринбург**

**Екатеринбург
2016**

УДК 57+61]:614.1
А 90

Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути её снижения: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Екатеринбург, 20-21 октября 2016 г / под ред. д-ра мед. наук В.Б. Гурвича. – Екатеринбург: Изд-во ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2016.– 121 с.

ISBN 978-5-93025-100-5

Широкое развитие нанотехнологий, использование и практическое применение наноматериалов в науке, технике и медицине в современных условиях обусловило необходимость оценки их вредного действия на организм, нормирования допустимых уровней содержания наночастиц в различных компонентах производственной среды и среды обитания гигиеническое значение наноразмерных частиц в составе аэрозолей, загрязняющих воздух помещений при давно существующих технологических процессах и окружающую атмосферу. Именно за последние десятилетия изучение характера и механизмов особой биологической активности (в том числе, токсичности) наночастиц развивается во многих странах мира все возрастающими темпами. В сборнике представлены материалы как российских исследователей разных учреждений и ведомств, так и зарубежных коллег, отражающие основные направления, некоторые итоги и перспективы гигиенической нанотоксикологии.

Материалы конференции предназначены для специалистов органов и организаций Роспотребнадзора, научно-исследовательских учреждений, специалистов по охране внешней и производственной среды промышленных предприятий, высших учебных заведений смежных областей науки и практики.

Редакционный совет:

доктор медицинских наук **В.Б. Гурвич** – председатель
доктор медицинских наук, профессор **Б.А. Кацнельсон**
доктор медицинских наук, профессор **С.В. Кузьмин**
доктор медицинских наук, профессор **Э.Г. Плотко**,
доктор медицинских наук, профессор **Л.И. Привалова**
кандидат медицинских наук **О.В. Широкова** – отв. секретарь

Рецензенты:

д-р мед. наук, проф. **Э.Г. Плотко**
д-р мед. наук, проф. **Б.А. Кацнельсон**
д-р мед. наук, проф. **Л.И. Привалова**
кандидат медицинских наук **О.В. Широкова**

Перевод на английский язык: **Е.В. Забурунова, В.Г. Гафуров**

ISBN 978-5-93025-100-5

© ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП
Роспотребнадзора, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Альфарио-Морено Э.</i> Местное и системное действие ингалируемых частиц и наночастиц	10
<i>Британов Н. Г., Горкина И. К., Клаучек В. В., Почепцов А. Я., Точилкина Л. П., Филатов Б. Н.</i> Гигиенические проблемы, связанные с производством и применением искусственных наноматериалов	11
<i>Вогель У., Сабер А. Т., Якобсен Н. Р., Поульсен С. С., Йяук К., Халаппанавар С., Валлин Х.</i> Вызванная наноматериалами легочная реакция острой фазы представляет собой причинно-следственную связь между ингаляционным воздействием наноматериалов и риском сердечно-сосудистых заболеваний	14
<i>Воробьев А. В., Сигаев В. И., Толчинский А. Д. Успенская С. Н., Иванова Ю. В., Звягина Е. В., Рыбалкин С. П., Михина Л. В., Бесаева С. Г., Мазанова А. А., Дядищев Н. Р.</i> Оценка ингаляционной токсичности многостенных углеродных нанотрубок для крыс по результатам острого и хронического экспериментов	16
<i>Ву С.-Ю., Се М.-Ф.</i> Применение липосомных катехинов для борьбы с активируемыми липополисахаридами микроглиальными клетками мышей	19
<i>Гурвич В. Б., Кацнельсон Б. А., Рузаков В. О., Привалова Л. И., Бушуева Т. В., Гребенкина С. В.</i> Биохимические эффекты у рабочих, подвергающихся влиянию аэрозолей металлургического производства меди, содержащих наночастицы	21
<i>Гусев А. А., Васюкова И. А., Захарова О. В., Ткачев А. Г.</i> Эколого-токсикологическая оценка многостенных углеродных нанотрубок	23
<i>Ди Морайс П. С.</i> Оценка экотоксичности магнитного нанокompозитного материала на основе расслоенного вермикулита, разработанного для устранения последствий разлива нефти	24
<i>Захаренко А. М., Энгин А. Б., Чернышев В. В., Чайка В. В., Угай С. М., Никифоров П. А., Андреев В. В., Дрозд В. А., Никитина А. В., Соломенник С. Ф., Кудрявкина О. Р., Лю С., Юань В., Цацакис А. М., Голохваст К. С.</i> Хроническое аллергическое воспаление, опосредованное базофилами, при воздействии частиц автотранспортных выхлопов	25

<i>Зайцева Н. В., Землянова М. А., Звездин В. Н., Довбыш А. А.</i> Токсиколого-гигиеническая характеристика некоторых металлсодержащих наночастиц при различных способах экспозиции: бионакопление и морфофункциональные особенности воздействия	26
<i>Зайцева Н. В., Уланова Т. С., Злобина А. В., Волкова М. В., Гилева М. И.</i> Исследования наноразмерных частиц в составе промышленных аэрозолей и взвешенных веществ в воздухе рабочей зоны	31
<i>Ингель Ф. И.</i> Наночастицы одного состава, но разного размера индуцируют генетическую нестабильность по качественно разным механизмам	34
<i>Кашанский С. В., Ильдербаев О. З., Чуленбаева Л. Е.</i> Сочетанное воздействие вредных производственных факторов на перекисное окисление липидов организма	36
<i>Минигалиева И. А., Кацнельсон Б. А., Привалова Л. И., Сутункова М. П., Валамина И. Е., Шур В. Я., Шишкина Е. В., Макеев О. Г., Вараксин А. Н., Панов В. Г.</i> Некоторые общие закономерности и частные особенности комбинированной токсичности металлсодержащих наночастиц (эксперименты и математическое моделирование)	39
<i>Мошкин М. П.</i> Нейробиологические эффекты наноразмерных аэрозолей	40
<i>Привалова Л. И., Кацнельсон Б. А., Гурвич В. Б., Минигалиева И. А., Сутункова М. П., Григорьева Е. В., Макеев О. Г., Валамина И. Е., Шур В. Я., Шишкина Е. В.</i> О принципах и способах повышения резистентности организма к вредным эффектам металлсодержащих наночастиц	42
<i>Проценко Д. А., Дорофеева Н. В., Шамбатов М. А., Мелехин В. В., Макеев О. Г.</i> Исследование цитотоксического профиля наночастиц оксида марганца (II, III) и оксида никеля (II) на культуре фибробластов человека	43
<i>Пьянова Л. Г., Седанова А. В., Лихолобов В. А.</i> Эффективные и безопасные модифицированные углеродные сорбенты медицинского и ветеринарного назначения на основе наноглобулярного углерода	46
<i>Радилов А. С., Глушкова А. В., Дулов С. А., Рембовский В. Р.</i> Ориентировочные гигиенические нормативы аэрозолей наночастиц в воздухе рабочей зоны и упреждающая оценка риска	48

Слышкина Т. В., Гурвич В. Б., Рослый О. Ф., Мартин С. В., Галашева О. Е.	
Методические подходы к количественному измерению наноаэрозоля в воздухе	52
Сутункова М. П., Привалова Л. И., Кацнельсон Б. А., Гурвич В. Б., Минигалиева И. А., Соловьёва С. Н., Шишкина Е. В., Зубарев И. В.	
О соотношении физиологических и физико-химических механизмов, определяющих лёгочную токсикокинетику металлсодержащих наночастиц, отлагающихся при хронической ингаляционной экспозиции (на примере Fe ₂ O ₃)	53
Фатхутдинова Л. М.	
Характеристика производственных экспозиций и медико-биологических эффектов многостенных углеродных нанотрубок	54
Фрёлх Э.	
Модели in vitro для оценки кратковременного и длительного воздействия наночастиц	57
Цацакис А. М.	
Оценка рисков воздействия вредных веществ в реальных условиях	58
Чащин В. П., Горбанев С. А., Эллинген Д., Томассен Ю.	
Применение биомаркеров вредного влияния наноразмерных аэрозолей на организм для оценки и прогнозирования риска нарушений здоровья у работников горнодобывающих предприятий	59
Шабашева Л. В., Протасова Г. А., Панферова Ю. А., Попов В. Б.	
Изучение эмбрио-, цитогенетических и канцерогенных свойств наночастиц SiO ₂ в экспериментах in vitro	61
Шипелин В. А., Гмошинский И. В., Шумакова А. А., Хотимченко С. А.	
Протеомные и метаболомные маркеры нанотоксичности: современное состояние вопроса	64
Шур В. Я., Тюрнина А. Е., Кузнецов Д. К., Шишкина Е. В., Васильева Д. С., Важенин В. А., Потапов А. П., Морозова М. В., Зубарев И. В., Пряхина В. И.	
Вклад уральского центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» в экспериментальные исследования токсикологии наночастиц оксидов металлов	68
Янь Б.	
Нано-биологические взаимодействия: на примере многослойных углеродных нанотрубок	69

CONTENTS

Alfaro-Moreno E. Local and systemic effects induced by inhaled particles and nanoparticles	73
Britanov N. G., Gorkina I. K., Klauchek V. V., Pocheptsov A. Y., Tochilkina L. P., Filatov B. N. Hygienic issues associated with the production and application of engineered nanomaterials	73
De Morais P.-C. Ecotoxicity evaluation of exfoliated vermiculate-based magnetic Nanocomposite developed for oil spill remediation	76
Fatkhutdinova L. M. Characterization of occupational exposure to and medical-biological effects of multiwalled carbon nanotubes	76
Fröhlich E. In vitro models for the assessment of short and prolonged exposure to nanoparticles	79
Gorbanev S. A., Ellingsen D., Thomassen Y., Chashchin V. P. The use of biomarkers of effect for assessing and predicting the health risk related to occupational exposure to nanosized aerosols at mining operations	80
Gurvich V. B., Katsnelson B. A., Ruzakov B.O., Privalova L. I., Bushueva T. V., Grebenkina S. V. Biochemical effects in workers exposed to aerosols containing nanoparticles generated during metallurgical processing of copper	81
Gusev A. A., Vasyukova I. A., Zakharova O. V., Tkachev A. G. Ecotoxicological assessment of multiwalled carbon nanotubes	83
Ingel F. I. Nanoparticles of identical composition but different sizes induce genetic instability through qualitatively different mechanisms	84
Kashanskiy S. V., Ilderbaev O. Z., Chulenbaeva L. E. The combined effects of nanoscale carbon dust and radiation on lipid peroxidation in experimental animals	86
Minigalieva I. A., Katsnelson B. A., Privalova L. I., Sutunkova M. P., Valamina I. E., Shur V.Y., Shishkina E. V., Makeev O. G., Varaksin A. N., Panov V. G. Some general patterns and specific aspects of metal nanoparticle combined toxicity (experiments and mathematical modelling)	88

Moshkin M. P. Neurobiological effects of nanoscale aerosols	89
Privalova L. I., Katsnelson B. A., Gurvich V. B., Minigalieva I. A., Sutunkova M. P., Makeyev O. H., Valamina I. E., Shur V. Y., Grigoryeva E. V., Klinova S. V., Shishkina E. V. Some principles of and means for increasing organism's resistance to adverse effects of metallic nanoparticles	90
Proshchenko D. A., Dorofeeva N. V., Shambatov M. A., Melekhin V. V., Makeev O. G. Study of the cytotoxic profile of manganese oxide (II, III) and nickel oxide (II) nanoparticles on human fibroblast culture	91
Pyanova L. G., Sedanova A. V., Likholobov V. A. Effective and safe modified carbon sorbents based on nanoglobular carbon for medical and veterinary application	94
Radilov A. S., Glushkova A. V., Dulov S. A., Rembovsky V. R. Tentative hygienic standards for nanoparticle aerosols in workroom air and preemptive risk assessment	96
Shabasheva L. V., Protasova G. A., Panferova Y. A., Popov V. B. An in vitro study of embryogenic, cytogenic and carcinogenic properties of SiO ₂ nanoparticles	99
Shipelin V. A., Gmoshinsky I. V., Shumakova A. A., Khotimchenko S. A. Proteomic and metabolomic markers of nanotoxicity: state of the art review	101
Shur V. Y., Tyurnina A. E., Kuznetsov D. K., Shishkina E. V., Vasileva D. S., Vazhenin V. A., Potapov A. P., Morozova M. V., Zubarev I. V., Pryakhina V. I. The contribution of the ural centre for shared use «modern nanotechnology» to experimental toxicological studies of metal oxide nanoparticles	104
Slyshkina T. V., Gurvich V. B., Rosly O. F., Martin S. V., Galasheva O. E. Methodological approaches to quantitative measurement of nanoscale aerosol in the air	105
Sutunkova M. P., Privalova L. I., Katsnelson B. A., Gurvich V. B., Minigalieva I. A., Solovyeva S. N., Shishkina E. V., Zubarev I. V. The relative contribution of physiological and physico-chemical mechanisms to controlling pulmonary toxicokinetics of metal nanoparticles deposited under chronic inhalation exposure to Fe ₂ O ₃	106
Tsatsakis A. M. Evaluating risks of real life exposures	106

<i>Vogel U., Saber A. T., Jacobsen N. R., Poulsen S. S., Yauk C., Halappanavar S., Wallin H.</i>	
Nanomaterial-induced pulmonary acute phase response constitutes a causal link between inhalation of nanomaterials and risk of cardiovascular disease	107
<i>Vorob'ev A. V., Sigaev V. I., Tolchinskiy A. D., Uspenskaya S. N., Ivanova Yu. V., Zvyagina E. V., Rybalkin S. P., Mikhina L. V., Besaeva S. G., Mazanova A. A., Dyadishchev N. R.</i>	
Inhalation toxicity assessment of multiwalled carbon nanotubes in rats based on the acute and chronic experiment results	109
<i>Wu X.-Y., Hsieh M.-F.</i>	
Liposomal catechins for combating lipopolysaccharides-activated mouse microglial cells	111
<i>Yan B.</i>	
Nano-bio interactions: the story of multiwalled carbon nanotubes	113
<i>Zaytseva N. V., Ulanova T. S., Zlobina A. V., Volkova M. V., Gileva M. I.</i>	
The study of nanoparticles as components of industrial aerosols and suspended particulate matter in work zone air	114
<i>Zaitseva N. V., Zemlyanova M. A., Zvezdin V. N., Dovbysh A. A.</i>	
Toxicological and environmental health characterization of some metallic nanoparticles depending on the exposure type: bioaccumulation and morphofunctional outcomes	116
<i>Zakharenko A. M., Engin A. B., Chernyshev V. V., Chaika V. V., Ugay S. M., Nikiforov P. A., Andreev V. V., Drozd V. A., Nikitina A. V., Solomennik S. F., Kudryavkina O. R., Liu X., Yuan W., Tsatsakis A. M., Golokhvast K. S.</i>	
Basophil mediated chronic allergic inflammation in vehicle-emitted particles exposure	120

ПРЕДИСЛОВИЕ

Проведение Всероссийской научно-практической конференции с международным участием **«Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути её снижения»** обусловлено все возрастающим развитием научных основ и практического применения нанотехнологий, которое привело к созданию десятков искусственных, или так называемых конструированных (engineered) наноматериалов.

Наряду с этим, развитие исследований в области нанотехнологий и наномедицины обратило внимание на серьезное и все еще недостаточно оцененное гигиеническое значение наноразмерных частиц в составе аэрозолей, загрязняющих воздух производственных помещений и окружающую атмосферу при давно существующих технологических процессах.

За последние 10-12 лет изучение характера и механизмов особой биологической активности (в том числе, токсичности) наночастиц развивается во многих странах мира все нарастающими темпами, что обусловило формирование самостоятельной ветви токсикологической науки – нанотоксикологии.

В последние годы исследования этого направления достигли определенного развития в научно-исследовательских учреждениях России, включая научные учреждения Роспотребнадзора, и зарубежом.

Материалы, которые представлены в данном сборнике трудов российскими и зарубежными исследователями демонстрируют достигнутые успехи и определяют наиболее актуальные задачи гигиенической нанотоксикологии.

Наиболее интересные и значимые материалы будут заслушаны и обсуждены в виде докладов на самой конференции.

Надеемся, что опубликованные в сборнике материалы вызовут интерес и будут полезны для решения проблем гигиены и нанотоксикологии, развития методических подходов и установления безопасных уровней воздействия наноматериалов на работающих и население, повышению резистентности организма к их вредному действию.

Редакционный совет

МЕСТНОЕ И СИСТЕМНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГАЛИРУЕМЫХ ЧАСТИЦ И НАНОЧАСТИЦ

Альфари-Морено Э.

*Шведский научно-исследовательский токсикологический центр, Швеция
Национальный онкологический институт, Мексика
E-mail: ealfaro.incan@gmail.com*

Человек издавна подвергается ингаляционному воздействию частиц. По данным проводимых в 20-м веке эпидемиологических исследований, воздействие угольной пыли, асбеста и других минералов на шахтёров привело к возникновению у последних лёгочных заболеваний, таких как фиброз лёгких и рак. В качестве фактора риска, способствующего возникновению заболеваний лёгких и системы кровообращения, выделяется также воздействие частиц в условиях города. Из-за неблагоприятных исходов, связанных с попаданием частиц в дыхательные пути, были приняты многочисленные меры для того, чтобы защитить население от вредного воздействия на территории города, в помещениях и на рабочих местах.

За последние 30 лет были получены тысячи видов новых частиц размером менее 100 нм, а токсикологические исследования многих из них толком не проводились. Ингалируемые частицы размером менее 10 нм могут проникнуть в нижние дыхательные пути, а частицы размером менее 3 нм могут достигнуть лёгких. Частицы размером менее 0,1 нм могут переместиться из лёгких в кровеносную систему и таким образом попасть в отдаленные органы. К наиболее серьёзным неблагоприятным исходам попадания частиц в дыхательные пути относятся: местное и системное воспаление, фиброз лёгких, рак лёгких, сокращение времени свёртывания крови, дисфункция эндотелия, изменение вязкости плазмы, также недавно было высказано предположение о том, что проникновение наночастиц в мозг, может иметь отношение к болезням Паркинсона и Альцгеймера.

ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С ПРОИЗВОДСТВОМ И ПРИМЕНЕНИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

**Британов Н. Г., Горкина И. К., Клаучек В. В., Почепцов А. Я.,
Точилкина Л. П., Филатов Б. Н.**

*ФГУП «НИИ гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России,
Волгоград, Россия
E-mail: filatov@rihtop.ru*

В России в настоящее время, несмотря на существенное отставание от Запада в некоторых отраслях промышленности, наблюдается постепенное внедрение нанотехнологий. Прогрессивное значение таких технологий очевидно и не нуждается в обсуждении, но также очевидно и то, что производство наноматериалов и их промышленное использование без проведения полноценных санитарно-гигиенических исследований может наносить вред, прежде всего здоровью производственного персонала [1-4].

Безусловно, первостепенным является гигиеническое регламентирование допустимого содержания наночастиц в воздухе рабочей зоны и обеспечение работ без загрязнения производственной среды наночастицами, для чего необходима соответствующая технология производства и должный санитарно-химический контроль. Однако именно с этого и начинаются медико-гигиенические проблемы обеспечения безопасности людей при внедрении нанотехнологий. К сожалению, как всегда при внедрении и развитии принципиально новых технологий, оценка возможных неблагоприятных последствий применения нанотехнологий осуществляется чрезвычайно медленно. Отчасти это можно объяснить успокоенностью в связи достаточной изученностью исходных макроформ. Однако проведенные исследования по оценке возможной опасности наночастиц для человека показывают, что они могут представлять, как прямые, так и косвенные опасности, которые возникнут в связи с недостаточной изученностью или нарушениями разработки процесса [5, 6].

Основные проблемы в данном случае, как никогда ранее при внедрении в производство новых технологий, связаны с осуществлением исследований по гигиеническому регламентированию содержания наночастиц в воздухе рабочей зоны в виду их чрезвычайного разнообразия и специфичных особенностей [6]. Практически, по крайней мере, на первых порах, напрашивается потребность изучения качественного и количественного состава наночастиц реально загрязняющих воздух рабочей зоны соответствующих производств с обоснованием их гигиенических нормативов. Естественно, это приведет к высоким затратам на выполнение исследований, что, безусловно, реально для осуществления лишь при государственном финансировании исследований, особенно на стадии малотоннажных производств. Кроме того, учитывая ожидаемый в данном случае многокомпонентный состав загрязнителей воздуха

рабочей зоны, целесообразно рассмотреть возможность оценки риска для здоровья производственного персонала комбинированного воздействия загрязнителей.

Следующая проблема – камерное оборудование для ингаляционных воздействий. Оборудование, имеющееся в научно-исследовательских организациях, занимающихся вопросами санитарно-гигиенического нормирования химических веществ, как в воздухе рабочей зоны, так и атмосферном, в большинстве своем не может быть использовано для создания и контроля заданных концентраций наночастиц без специальных технических приставок и разработки соответствующих методических приемов. Импортные «затравочные» камеры, оснащенные генераторами наноаэрозолей, для российских институтов сегодня в большинстве своем чрезмерно дороги и мало доступны.

В ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России проводятся работы по качественной и количественной оценке степени загрязнения воздуха рабочей зоны наночастицами в производствах твердых ракетных топлив, взрывчатых веществ и порохов, в которых широко используются процессы измельчения их твердых компонентов. Эти процессы являются потенциальными источниками неконтролируемого образования наночастиц, способных загрязнять производственную среду. Кроме того, в этих производствах для улучшения характеристик энергетических конденсированных систем все чаще находят применение наноматериалы. Предполагается, что воздействие наночастиц на организм обуславливает развитие специфической картины патологии, проявляющейся отсроченными или отдаленными последствиями [7].

Имеющиеся сегодня гигиенические нормативы наночастиц утверждены в основном для продуктов питания. Причем для осуществления санитарного контроля предлагаются методические рекомендации, которые подходят для качественного анализа и иногда для идентификации наночастиц, но мало пригодны или вообще не пригодны для количественного анализа наночастиц, тем более в воздухе [8, 9].

Для крупномасштабных производств наноматериалов предстоит разработка гигиенических нормативов наночастиц для объектов окружающей среды. В этом направлении видятся еще большие сложности, в частности с нормированием содержания наночастиц в атмосферном воздухе, воде и почве.

И это лишь начальный этап выполнения разработок необходимых для обеспечения безопасности персонала и населения, проживающего в зоне влияния производств наноматериалов.

Параллельно с нормированием наночастиц для обеспечения безопасности для человека производств наноматериалов или их использования должны внедряться прочие гигиенические аспекты. Так, защита от нежелательного воздействия на человека наночастиц и наноматериалов в процессе производства теоретически может быть обеспечена какой-либо формой изоляции от них, например, изолирующими средствами индивидуальной защиты. Однако на сегодняшний день отсутствуют данные по оценке защитной эффективности существующих средств индивидуальной защиты от наночастиц.

Все изложенное демонстрирует наличие проблем оценки и управления риском для здоровья лиц, контактирующих с наночастицами в процессе производства и использования наноматериалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филатов Б.Н. Санитарно-гигиенические проблемы обеспечения безопасности производства и применения наноматериалов / Б.Н. Филатов // Токсикологические и нормативные аспекты производства и применения наноматериалов в России: Тез. междунар. конф. – М., 2009. – С. 52.
2. Токсиколого-гигиенические аспекты проблемы безопасности производства продукции на основе наночастиц золота / Б.Н. Филатов, Л.П. Точилкина, Л.Ю. Бочарова, А.А. Масленников и др. // Токсикологический вестник. – 2010. – №3. – С. 30-33.
3. Перспективы развития токсикологии с позиций нанотехнологий и синтетической биологии / Б.Н. Филатов, В.И. Вареник, В.А. Николаев, В.В. Клаучек: Сб. тр. IV съезда токсикологов России. – М., 2013. – С. 45-46.
4. Производство и применение наноматериалов (токсиколого-гигиенические проблемы) / Б.Н. Филатов, Л.Ю. Бочарова, В.В. Клаучек, А.А. Масленников и др. // Medline.ru. – Фундаментальные исследования, 2015. – Т. 16, ст. 22. – С. 259-266. [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://www.medline.ru/public/art/tom16/art22.html>. – 14.08.2016
5. Сравнительно-экспериментальная оценка токсичности некоторых наноматериалов / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутникова, Т.Д. Дегтярева и др.: Материалы XI Всеросс. съезда гигиенистов и санитарных врачей. – М., 2012. – Т.1. – С. 452-453.
6. Халл М. Нанотехнологии и экология: риски, нормативно-правовое регулирование и управление / М. Халл, Д. Боумен. – М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 334 с.
7. Нарушения постнатального развития, индуцированные в эксперименте пренатальным воздействием аутопрепаратов / Л.П. Точилкина, Л.Ю. Бочарова, Н.В. Ходыкина, О.Н. Новикова и др. // Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях: Сб. тр. науч.-практ. конф. –С-Пб., 2010. – С. 236-238.
8. Разработка технических средств и методических приемов создания аэрозолей наноматериалов для проведения острых и хронических ингаляционных токсикологических экспериментов / В.И. Сигаев, А.Д. Толчинский, А.В. Воробьев, Н.Р. Дядищев и др. // Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы: Матер. науч. конф. – Волгоград, 2014. – С. 55-57.
9. Горкина И.К. Проблемы санитарно-химического контроля наночастиц металлов в воде / И.К. Горкина, И.Э. Пильдус // Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы: Матер. науч. конф. – Волгоград, 2014. – С. 32-34.

ВЫЗВАННАЯ НАНОМАТЕРИАЛАМИ ЛЕГОЧНАЯ РЕАКЦИЯ ОСТРОЙ ФАЗЫ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННУЮ СВЯЗЬ МЕЖДУ ИНГАЛЯЦИОННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАНОМАТЕРИАЛОВ И РИСКОМ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Вогель У.¹, Сабер А. Т.¹, Якобсен Н. Р.¹, Поульсен С. С.¹, Йяук К.², Халаппанавар С.², Валлин Х.¹

¹*Национальный научно-исследовательский центр гигиены труда,
Копенгаген, Дания*

²*Научно-исследовательское бюро гигиены окружающей среды,
Министерство здравоохранения Канады
E-mail: UBV@arbejdsmiljoforskning.dk*

В эпидемиологических исследованиях ингаляция частиц сопряжена с повышением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Ингаляция частиц вызывает воспаление лёгких, пропорциональное суммарной поверхности вдыхаемых или отложившихся наноматериалов. Полногеномное изучение транскрипции генов лёгочной ткани мышей после ингаляционного воздействия наночастиц TiO₂ в течение 11 дней подряд показало, что наиболее дифференциально регулируемым геном является белок острой фазы – сывороточный амилоид А3 [1]. Реакция острой фазы – это системная реакция на сигнал тревоги [2], а уровни содержания белков острой фазы С-реактивного белка и сывороточного амилоида А связаны с повышением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в проспективных исследованиях [3].

Недавно нами установлено, что воздействие на лёгкие наноматериалов, включая частицы технического углерода, диоксида титана, углеродные нанотрубки и частицы дизельного выхлопа [4], вызывает зависимость от времени и дозы реакцию острой фазы как по количеству дифференциально экспрессированных генов реакции острой фазы, так и по увеличению в несколько раз сывороточного амилоида А3, наиболее дифференциально экспрессированного гена реакции острой фазы [5]. Индуцирование лёгочной реакции острой фазы было также продемонстрировано на белковом уровне. Например, измеренные методом вестерн-блоттинг уровни содержания сывороточного амилоида А3 в лёгочной ткани повысились в 2,2 раза через 5 дней после ингаляционного воздействия наноразмерного TiO₂ [1], также повысились уровни содержания сывороточного амилоида А3 в бронхоальвеолярной жидкости и плазме после интратрахеального введения многослойных углеродных нанотрубок [6]. Уровни содержания сывороточного амилоида А3 в плазме коррелировали с уровнями содержания лёгочного сывороточного амилоида А3 мРНК после воздействия на лёгкие углеродных нанотрубок [7].

Лёгочная реакция острой фазы, оцененная по уровням содержания сывороточного амилоида А3, тесно коррелирует с притоком нейтрофилов [6] и суммарной поверхностью отложившихся наноматериалов [5]. Это позволяет предполагать, что ингаляция наноразмерных частиц вызовет более сильную реакцию острой фазы по сравнению с более крупными частицами при одинаковой общей массе, а также то, что сопутствующий риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний должен быть пропорционален увеличению суммарной поверхности. Это становится особенно актуально при обсуждении уровней производственного воздействия наночастиц, и подчёркивает важность профессионального воздействия в контексте сердечно-сосудистых заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S.Halappanavar, P.Jackson, A.Williams, K.A.Jensen, K.S.Hougaard, U.Vogel, C.L.Yauk, H.Wallin. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: A toxicogenomic study, *Environ Mol Mutagen* 52 (2011) 425-439.
2. C.Gabay, I.Kushner. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *New England Journal of Medicine* 340 (1999) 448-454.
3. P.M.Ridker, C.H.Hennekens, J.E.Buring, N.Rifai. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women, *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 836-843.
4. Z.O.Kyjovska, N.R.Jacobsen, A.T.Saber, S.Bengtson, P.Jackson, H.Wallin, U.Vogel. DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice, *Mutagenesis* (2015).
5. A.T.Saber, N.R.Jacobsen, P.Jackson, S.S.Poulsen, Z.O.Kyjovska, S.Halappanavar, C.L.Yauk, H.Wallin, U.Vogel. Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease, *Wiley. Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6 (2014) 517-531.
6. A.T.Saber, J.S.Lamson, N.R.Jacobsen, G.Ravn-Haren, K.S.Hougaard, A.N.Nyendi, P.Wahlberg, A.M.Madsen, P.Jackson, H.Wallin, U.Vogel. Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk, *PLoS. One.* 8 (2013) e69020.
7. S.S.Poulsen, A.T.Saber, A.Mortensen, J.Szarek, D.Wu, A.Williams, O.Andersen, N.R.Jacobsen, C.L.Yauk, H.Wallin, S.Halappanavar, U.Vogel. Changes in cholesterol homeostasis and acute phase response link pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes to risk of cardiovascular disease, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 283 (2015) 210-222.

ОЦЕНКА ИНГАЛЯЦИОННОЙ ТОКСИЧНОСТИ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ДЛЯ КРЫС ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТОВ

**Воробьев А. В., Сигаев В. И., Толчинский А. Д., Успенская С. Н.,
Иванова Ю. В., Звягина Е. В., Рыбалкин С. П., Михина Л. В.,
Бесаева С. Г., Мазанова А. А., Дядищев Н. Р.**

*НИЦ ТБП – филиал ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
Серпухов, Россия
E-mail: vsigaev@list.ru*

По экспертным оценкам среди общего количества синтезируемых в России углеродных нанотрубок (УНТ) 98 % приходится на многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) [1]. Поэтому всестороннее изучение токсических свойств МУНТ является наиболее актуальной задачей при проведении научно-исследовательских работ по санитарно-гигиеническому нормированию при их производстве и применении.

Исследованиям токсических свойств МУНТ, при ингаляционном способе их поступления в органы дыхания лабораторных животных (мыши, крысы), в последнее время посвящено большое количество публикаций в научной литературе.

В ряде исследований приведены результаты экспонирования лабораторных животных в атмосфере различных концентраций МУНТ в течение одного или нескольких дней. Stepleton P.A. et al. (2012) отмечают, что после однократного ингаляционного введения МУНТ крысам при концентрации 5 мг/м³ и последующего наблюдения в течение 4-х дней отмечалась воспалительная реакция и легочная токсичность [2]. Воздействие МУНТ приводило к значительному увеличению в бронхоальвеолярной жидкости количества полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ), активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрации общего белка. Ruman-Rasmussen et al. (2009) выявили формирование фиброзных изменений в легких подопытных мышей через 14 дней наблюдения после однократного ингаляционного введения МУНТ в концентрации 100 мг/м³ в течение 6 часов [3].

В литературе присутствуют лишь единичные сообщения об изучении токсичности МУНТ при многомесячном ингаляционном введении их лабораторным животным (крысы). Так, в сообщении Ma-Hock L. et al. (2009) приведены результаты изучения ингаляционной токсичности МУНТ при введении их крысам в концентрациях 0,1 мг/м³, 0,5 мг/м³ и 2,5 мг/м³ в течение 3-х месяцев [4]. Pauluhn J. (2010) проводил ингаляционное введение МУНТ крысам при концентрациях 0,1 мг/м³, 0,4 мг/м³, 1,5 мг/м³ и 6 мг/м³ в течение 13 недель. Автор отмечает увеличение количества ПМЛ, растворимого коллагена в бронхоальвеолярной жидкости, а также повышение уровня общего белка и активности ЛДГ, при концентрациях аэрозоля МУНТ, начиная с 0,4 мг/м³ и

выше [5]. Гранулематозные изменения и бронхиолоальвеолярная гиперплазия наблюдались при концентрации МУНТ 6 мг/м³.

В проведенных нами ингаляционных токсикологических экспериментах были использованы многостенные углеродные нанотрубки Таунит-М, производства ООО «НаноТехЦентр», г. Тамбов [6].

Экспонирование животных (беспородные белые крысы-самцы) по системе «голова-нос» осуществляли в разработанной в НИЦ ТБП экспозиционной аэрозольной камерной установке ЭАКУ (патент РФ № 2552945) с использованием генератора сухих аэрозолей конструкции НИЦ ТБП, работа которого основана на принципах помола и «кипящего слоя». Характеристики устройств и методология работы с использованием этого оборудования были описаны нами ранее [7, 8]. Аэрозоль Таунит-М был представлен, преимущественно, частицами размерами 2-6 мкм (около 80 %). Среднемедианный диаметр частиц аэрозоля Таунит-М – 3,0 мкм.

Изучена острая ингаляционная токсичность многостенных углеродных нанотрубок Таунит-М при однократной ингаляции крыс в течение 4-х часов. В эксперименте изучены концентрации аэрозоля Таунит-М 111, 39, 14 и 6 мг/м³. По результатам эксперимента величина CL_{50} превышает максимальную исследованную концентрацию Таунит-М – 111 мг/м³ (5 показателей токсикометрии отличаются от контроля). В качестве порога острого действия обоснована концентрация 39 мг/м³ (3 показателя токсикометрии отличаются от контроля). Недействующая концентрация аэрозоля Таунит-М в остром опыте составила 14 мг/м³. На данной концентрации аэрозоля было отмечено только снижение доли лимфоцитов в лаважной жидкости через 14 суток после ингаляции. Остальные изученные параметры токсикометрии соответствовали наблюдаемому у контрольных животных.

Проведена хроническая ингаляционная затравка крыс аэрозолем многостенных углеродных нанотрубок Таунит-М. Затравки выполнялись по 4 часа в день, 5 дней в неделю, в течение 4-х месяцев. Изучены концентрации аэрозоля 25,5 и 1 мг/м³. Ингаляционная затравка крыс аэрозолем многостенных углеродных нанотрубок Таунит-М в концентрациях 25 мг/м³ в течение 4 месяцев вызывала развитие у животных пятнистого антракоза. Фиброзные изменения встречались только у отдельных животных и были выражены достаточно слабо.

Концентрация аэрозоля Таунит-М 25 мг/м³ оценена как действующая (12 показателей токсикометрии отличаются от контроля), а в качестве порога хронического действия обоснована концентрация 5 мг/м³ (7 показателей токсикометрии отличаются от контроля). Изученную в эксперименте концентрацию 1 мг/м³ предложено рассматривать как недействующую, т.к. выявленные достоверные на данной концентрации аэрозоля изменения носят не постоянный характер и существенно не отличаются от контрольных значений. Для уточнения этого показателя, вероятно, потребуется проведение исследований с более низкими концентрациями аэрозоля Таунит-М.

Изучено иммунотоксическое и сенсибилизирующее действие аэрозоля многостенных углеродных нанотрубок Таунит-М на группе крыс, выведенных из опыта через 1 месяц затравок по 5 дней в неделю по 4 часа в течение дня. Иммунотоксическое и сенсибилизирующее действие Таунит-М не установлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крестинин А.В. Проблемы и перспективы развития индустрии углеродных нанотрубок в России / А.В. Крестинин // Наноматериалы. – 2007. – Т.2, №5-6. – С. 18-23.

2. Impairment of Coronary Arteriolar Endothelium-Dependent Dilation after Multi Walled Carbon Nanotube Inhalation: A Time-Course Study / P.A. Stapleton, V.C. Minarchick, A.M. Cumpston, W. McKinney et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol.13. – P. 13781-13803.

3. Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes Potentiate Airway Fibrosis in Murine Allergic Asthma / J.P. Ryman-Rasmussen, E.W. Tewksbury, O.R. Moss, M.F. Cesta et al.// Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2009. – Vol.40. – P. 349-358.

4. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months / L. Ma-Hock, S. Treumann, V. Strauss, S. Brill // Toxicol. Sci. – 2009. – Vol.112. – P. 468-481.

5. Pauluhn J. Subchronic 13-Week Inhalation Exposure of Rats to Multiwalled Carbon Nanotubes: Toxic Effects Are Determined by Density of Agglomerate Structures, Not Fibrillar Structures / J. Pauluhn // J. Toxicol. Sci. – 2010. – Vol.113. – P. 226-242.

6. Ткачев А.Г. Углеродный наноматериал «Таунит» – структура, свойства, производство и применение / А.Г. Ткачев // Перспективные материалы. – 2007. – №3. – С. 5-9.

7. Разработка и испытания экспозиционной аэрозольной камерной установки для нормирования вредных веществ в воздухе рабочей зоны / А.Д. Толчинский, В.И. Сигаев, А.В. Воробьев, А.А. Мажинский // Прикладная токсикология. – 2014. – №1. – С. 10-17.

8. Технические и методологические аспекты перевода волокнистых углеродных материалов в аэрозольное состояние при проведении ингаляционных токсикологических экспериментов / В.И. Сигаев, А.Д. Толчинский, А.В. Воробьев, Е.В. Звягина // Прикладная токсикология. – 2015. – №1. – С. 44-54.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИПОСОМНЫХ КАТЕХИНОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С АКТИВИРУЕМЫМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ МИКРОГЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КРЫС

By С.-Ю, Се М.-Ф.

*Кафедра биомедицинской техники, Христианский Университет Чун Юань,
Таоюань, Тайвань
E-mail: mfhsieh@cycu.edu.tw*

Введение. У пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, происходит дегенерация дофаминергических нейронов чёрной субстанции среднего мозга. В мозгу здорового человека микроглиальные клетки, называемые фагоцитами, находятся в основном в состоянии покоя. Активация микроглии может привести к тому, что в поражённой части мозга начнётся выработка провоспалительных цитокинов. В последние годы в отчётах о клинических исследованиях сообщалось, что опосредованный микроглиальными клетками хронический воспалительный процесс частично способствует гибели дофаминергических нейронов. Для того чтобы ослабить этот симптом, изучаются возможности эпигаллокатахин-3-галлата (ЭГКГ), одного из полифенольных соединений с антиоксидантными свойствами, содержащихся в зелёном чае. ЭГКГ обладает свойством подавлять медиаторы воспаления, такие как оксид азота и TNF- α в активируемых липополисахаридами микроглиальных клетках путём понижающей регуляции экспрессии гена iNOS и TNF- α . В результате это вещество может существенно ослабить разрушающее воздействие микроглиальных клеток на нейроны. Однако ЭГКГ имеет ряд ограничений, обусловленных его водорастворимостью и малой биодоступностью при пероральном введении. По этой причине целью исследования является разработка наноразмерных липосом-носителей ЭГКГ.

Методы. Липидная смесь яичного фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и холестерина была растворена в хлороформе и для получения липидной мембраны высушена в ротационном испарителе. С помощью гидратирования липидной мембраны с ЭГКГ был получен первичный липосомный раствор. Далее раствор был профильтрован через мембрану с размером пор 200 нм и образовался наноразмерный липосомный раствор. Размер частиц был определён с помощью метода светорассеяния. ЭГКГ был экстрагирован из листьев зелёного чая. Сначала на линии микроглиальных клеток мышей (клеток BV2) проводилась оценка токсичности свободного ЭГКГ для определения его переносимой концентрации. Затем с помощью люминесцентной микроскопии был определён клеточный захват комплекса липосом и ЭГКГ. Далее на клетках BV2 исследовался противовоспалительный эффект комплекса липосом и ЭГКГ.

Результаты и обсуждение. Антиоксидантный эффект экстрагированного ЭГКГ был определён вычислением процентного содержания радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ), поглощённых эпигаллокатахин-3-

галлатом в течение инкубационного периода продолжительностью 30 минут. В течение 5 минут ЭГКГ в количестве 0,25 мг/мл может поглотить более 80%ДФПГ. Для определения переносимой концентрации ЭГКГ культивировались клетки BV2, содержащие ЭГКГ в разных концентрациях. Выяснилось, что ЭГКГ в количестве 50 μm или более может проявлять цитотоксичность, как показывает НСТ-тест. Средний размер частиц липосом с фосфатидилсерином, а также липосом с фосфатидилсерином и витамином Е после введения ЭГКГ составлял соответственно 132,9 и 142,9 нм. Анализ клеточного захвата с использованием флуоресцентного красителя РКН-26 показал, что в течение инкубационного периода продолжительностью 2 часа поглощение липосом с фосфатидилхолином клетками BV2 не происходило. С другой стороны, в цитоплазме были обнаружены липосомы с фосфатидилсерином, а также липосомы с фосфатидилсерином и витамином Е. После предварительной обработки липосомами в течение 1 часа клетки BV2 подвергли воздействию дозы липополисахаридов 50 нг/мл. У группы клеток с липосомами с фосфатидилсерином, а также липосомами с фосфатидилсерином и витамином Е наблюдалось снижение уровня цитокинов TNF- α . Из этих липосом наименьшее количество выделяемого цитокина TNF- α наблюдалось при введении ЭГКГ в липосомы с фосфатидилсерином и витамином Е.

Заключение. Дегенеративную болезнь Паркинсона сопровождает активация микроглиальных клеток. В ходе настоящего исследования были получены липосомы противовоспалительного действия, в состав которых входит экстрагированный из зелёного чая ЭГКГ, что позволит снизить выработку цитокина TNF- α . С помощью фильтрационной мембраны размеры частиц липосом регулировались в пределах 130-140 нм. Клеточное поглощение липосом в микроглиальных клетках мышей BV2 указывает на то, что фосфатидилсерин обладает большей эффективностью по сравнению с яичным фосфатидилхолином. Введение в липосому ЭГКГ и витамина Е, оказалось более эффективным для снижения уровня воспалительного цитокина TNF- α в культивируемой среде. Перспективность данного исследования, которая заключается в замедлении развития болезни Паркинсона, может быть далее подтверждена в экспериментах на животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vanna Sanna, Gianfranco Pintus, Anna Maria Roggio, et al., Targeted Biocompatible Nanoparticles for the Delivery of (-)-Epigallocatechin 3-Gallate to Prostate Cancer Cells, *Journal of Medicinal Chemistry* 54:1321-1332 (2011).
2. Rui Li, Yuan-Gui Huang, Du Fang, et al., (-)-Epigallocatechin Gallate Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Protects Against Inflammation-Mediated Dopaminergic Neuronal Injury, *Journal of Neuroscience Research* 78:723-731 (2004).

БИОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ У РАБОЧИХ, ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ВЛИЯНИЮ АЭРОЗОЛЕЙ МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА МЕДИ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ

**Гурвич В. Б., Кацнельсон Б. А., Рузаков В. О., Привалова Л. И.,
Бушуева Т. В., Гребенкина С. В.**

*ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики
и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора,
Екатеринбург, Россия
E-mail: gurvich@ymrc.ru*

Показано, что в условиях воздействия аэрозолей меди, с повышением доли наночастиц меди в общей массе аэрозоля, отмечается достоверное нарастание концентрации церулоплазмينا, а также достоверная связь с содержанием белка S100 и нейроспецифической энолазы в крови рабочих. При этом основное значение имеет не только общая концентрация меди в воздухе рабочей зоны, но и содержание соединений меди в виде наночастиц.

Пирометаллургические процессы, как и любая обработка материалов, связанная с эффектами дезинтеграции и конденсации материалов, сопровождается образованием аэрозолей сложного состава, содержащих наночастицы. Ранее в экспериментальных условиях нами показано, что наночастицы, имея большую площадь поверхности по отношению к объему, обладают значительно более высокой цито- и генотоксической активностью по сравнению с микрочастицами этих же материалов [1, 2, 3]

Цель исследования. Оценка дисперсионного и химического состава аэрозоля в воздухе рабочей зоны в условиях металлургического производства и влияния наночастиц меди на биохимические показатели у работников.

Материал и методы исследования. В качестве модели для исследований был выбран промышленный объект, осуществляющий переработку меди различными технологическим процессами. Для этой цели был определён перечень рабочих мест, которые, по нашему мнению, должны были быть одинаковы по химическому составу аэрозолей, и различаться по уровню содержания частиц нанометрового диапазона. Были выбраны: группа (сравнения) – рабочее место оператора узла затарки при производстве медных порошков и исследуемая группа – рабочее место плавильщика при производстве катанки из чистой меди. В обоих случаях для производства изделий используется чистая медь, прошедшая процесс электролитного рафинирования. В ходе изучения дисперсионного и химического состава аэрозоля в воздухе рабочей зоны было установлено, что место оператора узла затарки при производстве медных порошков характеризуется наибольшей концентрацией меди в воздухе рабочей зоны ($0,77 \pm 0,19$ мг/м³), где содержание частиц нанометрового диапазона составляет в среднем 2,3%. Рабочее место плавильщика при производстве катанки из чистой меди характеризовалось

наименьшим содержанием меди в воздухе рабочей зоны ($0,098 \pm 0,022$ мг/м³), но содержание наночастиц в общей массе аэрозоля близко к 100%.

Группы работников для исследования были сформированы по следующим критериям: пол мужской, непрерывный стаж в профессии более 10 лет, отсутствие выявленных заболеваний со стороны ЦНС, гепатобилиарной системы, почечной системы, отсутствие признаков злоупотребления алкоголем. Состояние здоровья работников оценивалось в соответствии с приказом МЗ и СР РФ от 12.04.2011 № 302н (ред. от 05.12.2014). Дополнительно исследовались следующие биохимические показатели: содержание меди в крови, в моче, церулоплазмينا, щелочной фосфотазы, общего белка в крови, креатинина сыворотки, креатинфосфокиназы, белков S100, нейронспецифической энолазы, микроальбумина в моче.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что среди лиц, прошедших обследование наблюдается статистически значимое изменение в биохимических показателях: прямая сильная зависимость в части нарастания уровня церулоплазмينا в крови с повышением содержания наночастиц в воздухе рабочей зоны ($r = 0.971$). Приоритетность воздействия наночастиц над общим уровнем меди в составе аэрозоля подтверждается одинаковым содержанием меди в крови работников обеих групп (14,08–15,37 мг/л, различия не достоверны) и уровнями церулоплазмينا в сыворотке крови (на который приходится приблизительно 95% всей сывороточной меди). Исследуемая группа характеризуется значительно большими уровнями церулоплазмينا в крови ($301,37 \pm 28,70$ мг/л) относительно группы сравнения ($168,82 \pm 18,77$ мг/л). При этом исследуемая группа подвергалась воздействию аэрозоля с наименьшей концентрацией меди, но с наибольшим вкладом наночастиц. Все межгрупповые различия по этому показателю статистически значимы ($p < 0,05$ по t Стьюдента).

Несмотря на отсутствие, статистически значимых межгрупповых различий в исследуемых группах по другим биохимическим показателям необходимо отметить, что выявлены сильные корреляционные связи между концентрациями наночастиц меди в воздухе и биохимическими показателями, характеризующими состояние нервной ткани, такими как содержания белка S100, так и активностью нейроспецифической энолазы. Эти различия могут быть объяснены разницей экспозиции групп наблюдения к частицам аэрозоля размером менее 100 нм. Соответственно, можно предположить, что вклад в формируемую в организме дозу меди от воздействия аэрозоля в большей степени зависит от доли наночастиц в его составе, чем от суммарной экспозиции меди. Выявленная закономерность может быть объяснена высокой скоростью растворения наночастиц в силу большей, по сравнению с более крупными частицами, площадью поверхности этих частиц.

Выводы. 1. Показано, что в условиях воздействия аэрозолей меди с повышением доли наночастиц меди в общей массе аэрозоля у работников основных профессий металлургического производства отмечается достоверное нарастание концентрации церулоплазмينا в крови, при этом основное значение

имеет содержание соединений меди в виде наночастиц, а не только общая концентрация меди в воздухе рабочей зоны.

2. При увеличении экспозиции организма к наночастицам меди в виде аэрозоля наблюдаются эффекты, которые косвенно могут свидетельствовать об изменении биокинетики меди в организме и возможных негативных эффектах в уровне отдельных органов и систем, что требует дополнительного изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Экспериментальные данные к оценке пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазонов / С.В. Кузьмин, Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, Е.В. Николаева и др. // Токсикологический вестник. – 2010. – №2. – С. 17-24.

2. Кацнельсон Б.А. К проблеме обоснования ориентировочных безопасных уровней воздействия металлосодержащих наночастиц в воздухе рабочей зоны / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, Т.Д. Дегтярева // Токсикологический вестник. – 2012. – №4. – С. 26-29.

3. Биологическая активность наночастиц меди / О.А. Богословская, Т.А. Байтукалов, Н.Н. Глущенко и др. // Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармацевтика): тез. докл. науч.-практ. конф. – Ростов-н/Д., 2006. – С.71–72.

УДК 615.9

ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Гусев А. А.^{1,2,3}, Васюкова И. А.¹, Захарова О. В.¹, Ткачев А. Г.⁴,

¹ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет имени Г. Р. Державина»,
Тамбов, Россия

²ФГАОУ ВО НИТУ «Московский институт стали и сплавов» (МИСиС)
Москва, Россия

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,
Томск, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет»,
Тамбов, Россия

E-mail: nanosecurity@mail.ru

Экологические эффекты многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) к настоящему времени мало изучены. Нами проведено комплексное экотоксикологическое исследование МУНТ марки «Таунит» (ООО «НаноТехЦентр», г. Тамбов) с использованием широкого спектра тест-объектов: различных эколого-функциональных групп организмов: сапротрофы (бактерии) *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919, *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887, *E. coli* M-17 (тест-система «Эколюм»);

водные авто- и гетеротрофы: фитопланктон (микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, 1835) и зоопланктон (ракообразные *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900, личинки насекомых *Chironomus riparius* Meigen, 1804); наземные автотрофы (высшие растения *Onobrychis arenaria* (Kit) Ser. 1825) и гетеротрофы (млекопитающие *Mus musculus* Linnaeus 1758, гибриды C57B/6×DBA2).

Разработана экспериментальная модель поступления МУНТ в биообъекты посредством создания водных суспензий. Оценен уровень потенциальной опасности МУНТ. Показаны различия в биологических эффектах, связанные с особенностями структуры углеродных материалов на примере сажи и МУНТ. Установлена безопасная для бактерий и гидробионтов концентрация МУНТ в водной среде. Исследованы механизмы воздействия МУНТ на высшие растения. Отмечены гепатотоксический, нефротоксический, пневмотоксический и репродуктивно-токсический эффекты МУНТ при пероральном введении лабораторным мышам. Созданы научно-методические основы для определения пределов толерантности биообъектов по отношению к МУНТ и разработки экологически обоснованных норм их содержания в средах.

УДК 625.9:628.2

ОЦЕНКА ЭКОТОКСИЧНОСТИ МАГНИТНОГО НАНОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ РАССЛОЁННОГО ВЕРМИКУЛИТА, РАЗРАБОТАННОГО ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ РАЗЛИВА НЕФТИ

Ди Морайс П. С.

*Аньхойский университет, Факультет химии и химической технологии,
Хэфэй, Китай
E-mail: psmor@unb.br*

Магнитный расслоённый вермикулит является искусственным нанокompозитным материалом, разработанным для быстрого и эффективного поглощения нефти с поверхности водоёмов, пострадавших от нефтяного разлива. Материал был разработан в первую очередь для борьбы с загрязнением окружающей среды, но в настоящее время проводится оценка его возможного неблагоприятного воздействия при практическом применении. В этой связи в настоящем докладе сообщается о предварительной оценке экотоксичности магнитного и немагнитного расслоённого вермикулита с использованием биомаркёров генотоксичности и гистопатологических биомаркёров на рыбах данио (*Danio rerio*). После воздействия на данио магнитного и немагнитного вермикулита (до 200 мг/л) для оценки экотоксичности этого нанокompозитного материала использовались данные о фрагментации ДНК, частоте микроядер, патологических изменениях ядер и гистопатологических изменениях. Результаты исследования говорят о том, что

применение магнитного и немагнитного расслоённого вермикулита может вызывать повреждение ДНК в организме данио, однако наблюдаемые нарушения, вероятно, будут обратимы, что указывает на то, что данный нанокompозитный материал может способствовать генотоксическим нарушениям, но мутагенным действием не обладает.

УДК 656.1:504.056:616-056

ХРОНИЧЕСКОЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ, ОПОСРЕДОВАННОЕ БАЗОФИЛАМИ, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЧАСТИЦ АВТОТРАНСПОРТНЫХ ВЫХЛОПОВ

**Захаренко А. М.¹, Энгин А. Б.², Чернышев В. В.¹, Чайка В. В.¹, Угай С. М.¹,
Никифоров П. А.¹, Андреев В. В.¹, Дрозд В. А.¹, Никитина А. В.¹,
Соломенник С. Ф.¹, Кудрявкина О. Р.¹, Лю С.⁴, Юань В.⁴,
Цацакис А. М.^{1,3}, Голохваст К. С.¹**

¹*Дальневосточный федеральный университет, Инженерная школа,
Научно-образовательный центр «Нанотехнологии»,
Владивосток, Россия*

²*Университет Гази, Факультет фармации, Кафедра токсикологии,
Анкара, Турция*

³*Университет Крита, Медицинский факультет,
Кафедра токсикологии и судебной медицины,
Ретимнон, Греция*

⁴*Шаньдунская академия естественных наук, Институт биологии,
Цзинань, Китай*

E-mail address: droopy@mail.ru, abengin@gmail.com

Несмотря на то, что производители двигателей разрабатывают новую технологию сокращения автомобильных выхлопов, выделяемым с выхлопными газами твёрдым частицам уделяется недостаточное внимание. Тем не менее, частицы дизельных выхлопов (ЧДВ) являются крупным источником воздушного загрязнения. Они содержат огромное количество полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и могут оказать отрицательное воздействие на иммунную систему, вызывая или усугубляя аллергические процессы. В настоящем исследовании были отобраны частицы транспортных выхлопов (ЧТВ) двух типов автомобилей (с двигателями, работающими на дизельном топливе (Д) и на бензине АИ-80), а также тепловозов (Т). В общей сложности 129 самцам мышей породы Куньмин SPF в возрасте четырёх недель были подкожно введены дозы ЧТВ 100, 250 и 500 мг/кг, а 15 мышей, получивших воду без частиц, составили контрольную группу. Оценивалась общая токсичность, также были определены изменения в иммунном статусе мышей по уровням экспрессии CD3, CD4, CD8, CD16, CD25. При воздействии любой из доз ЧТВ у мышей наблюдалось значительное увеличение размеров лёгких и селезёнки, сопровождаемое уменьшением массы зубной железы.

Несмотря на то, что при дозах в 100 мг/кг ЧТВ-Т или 100 и 250 мг/кг ЧТВ-Д и ЧТВ-АИ80 количество лейкоцитов у мышей уменьшилось, а число базофилов в крови возросло более чем в 10 раз. С другой стороны, после введения ЧТВ незначительно снизилось количество клеток CD25+, тогда как количество цитотоксичных Т-лейкоцитов сократилось в 10-40 раз по сравнению с контрольной группой. Можно сделать вывод, что ЧТВ могут играть роль адьювантов и вызывать или усиливать аллергические реакции. Таким образом, адьювантное действие ПАУ, содержащихся в частицах транспортных выхлопов возникает с активацией базофилов независимо от наличия аллергенов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда – грант №15-14-20032.

УДК 544.773:546.57:57.044:613.2615.9

ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ЭКСПОЗИЦИИ: БИОНАКОПЛЕНИЕ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Зайцева Н. В.^{1,2}, Землянова М. А.¹, Звездин В. Н.¹, Довбыш А. А.¹

¹ФБУН ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения,
Пермь, Россия

²ГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет
имени академика Е. А. Вагнера» Министерства здравоохранения России,
Пермь, Россия
E-mail: zem@fcrisk.ru

Интенсивное формирование нанокластеров за рубежом и в РФ, развитие сегментов мирового рынка нанопродуктов в разрезе группы «Наноматериалы», рост коммерческих применений в ключевых отраслях (аэрокосмосе, здравоохранении, биотехнологиях, энергетике, электронике и информационных технологиях, обрабатывающей промышленности, в потребительском секторе [1]) диктует необходимость системного развития работ по изучению потенциальных угроз в сфере жизнедеятельности человека, связанных с широкомасштабным распространением нанотехнологий и нанобиотехнологии. Несмотря на неоспоримые инновационные качества наноматериалы, в том числе металлосодержащие наночастицы, в силу особых физико-химических свойств могут представлять определенную опасность для здоровья человека на всех этапах производства и потребления продукции, для объектов среды обитания и вызывать в будущем серьезные социально-экономические последствия [2]. В связи с этим, исследования, проводимые рядом отечественных научных центров, занимают значимое место по числу работ в этой области [3–6]. Особое внимание уделяется выявлению связи между

физическими свойствами (такими, как размер, форма, структура поверхности, степень агрегации) наноматериалов, в том числе металлсодержащих наночастиц, с индукцией токсического ответа в биологических структурах [7–10]. Данное направление на протяжении многих лет активно развивается в ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», в рамках которого выполняется уточнение и систематизация недостаточно изученных физических свойств и особенностей токсического воздействия ряда широко распространенных металлсодержащих наночастиц при ингаляционном и пероральном путях поступления в организм.

Цель исследования. Токсиколого-гигиеническая оценка бионакопления и морфофункциональных особенностей воздействия некоторых металлсодержащих наночастиц при ингаляционной и пероральной экспозиции.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на примере частиц нанодисперсного оксида марганца (MnO) и оксида никеля (NiO), характеризующиеся высокой степени потенциальной опасности для здоровья человека. Преобладающий средний поперечный размер частиц в наноразмерной фазе водной суспензии: MnO – 15-29 нм, NiO – 17-45 нм, что до 1300 раз и 330 раз соответственно меньше размера частиц микродисперсного аналога (метод сканирующей электронной микроскопии). Концентрация Mn и Ni в водной суспензии: $41,37 \pm 2,5$ мг/мл и $50,0 \pm 3,4$ мг/мл (в пересчете на MnO и на NiO соответственно) (метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500cx (Agilent Technologies Inc, США)).

Исследование функциональных и морфологических изменений выполнено на примере водной суспензии MnO при 90-дневном внутрижелудочном поступлении через зонд в диапазоне доз 1/10-1/500 LD50 на лабораторных животных (крысы самцы и самки линии Wistar массой 200 ± 10 г., n=100, 4 опытных и 1 контрольная группы) в соответствии с ГОСТ 32644-2014 и МУ 1.2.2520-09. Оценка функциональных нарушений выполнена по изменению биохимических показателей функции нейронов (по уровню глутамата и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в сыворотке крови) и баланса окислительно-антиоксидантной системы (по уровню гидроперекиси липидов и малонового диальдегида (МДА), Cu/Zn-супероксиддисмутазы (Cu/ZnСОД), общего антиоксидантного статуса (ОАС) в сыворотке крови). Морфологические изменения тканей (головного мозга, сердца, легких, селезенки, печени, почек, желудка и поджелудочной железы, тонкой и толстой кишки) оценивали при микроскопировании гистологических препаратов (увеличение $\times 400$), приготовленных в соответствии с принятой технологией на оборудовании Thermo Scientific и Carl Zeiss (Германия).

Исследование и оценка бионакопления (материальной кумуляции в ткани головного мозга, почках, печени, легких, крови) и морфологических изменений висцеральных органов (головного мозга, сердца, легких, селезенки, печени, почек, желудка и поджелудочной железы, тонкой и толстой кишки) выполнена на примере водной суспензии NiO при острой ингаляционной экспозиции (белые мыши самцы и самки линии BALB/C массой 25-30 г, n=30) в

соответствии ГОСТ 32646-2014, межгосударственным стандартом (OECD, Test No403:2008, IDT), МУ 1.2.2520-09. Моделирование ингаляционного поступления тестируемого вещества и сравнительно его микродисперсного аналога выполнено в Ингаляционной системе с интегрированным программным обеспечением с использованием камеры для всего тела (TSE Systems GmbH, Германия). Исследования и процедуры выполнены согласно руководствам и нормативным документам, регламентирующим соблюдение этических норм при проведении медико-биологических исследований с использованием животных.

Результаты. Исследование и оценка уровня показателей баланса нейромедиаторов и окислительно-антиоксидатной системы свидетельствует о наличии функциональных нарушений, имеющих дозозависимый эффект, при длительной экспозиции нанодисперсного MnO. В дозах 10,0-260,0 мг/кг на 30-й день эксперимента зарегистрировано достоверное повышение в сыворотке крови гидроперекиси липидов и МДА относительно исходного уровня и показателями контрольной группы в 1,4-1,9 и 1,6-2,0 раза соответственно ($p < 0,001$). На 90-й день сохранялся повышенный уровень гидроперекиси липидов и МДА в сыворотке крови, кратность различий с исходным уровнем и показателями в контроле составила 1,3-1,9 раза ($p < 0,001$). В дозе 5,0 мг/кг не установлено достоверных различий показатели с исходным уровнем и с контролем в течение всего эксперимента. Оценка показателей активности антиоксидантной системы свидетельствует, что у крыс в дозах 10,0-260,0 мг/кг при длительном введении регистрируется достоверное снижение уровня Cu/ZnСОД и ОАС в сыворотке крови, имеющее дозозависимый характер. В течение всего эксперимента уровень Cu/ZnСОД зарегистрирован сниженным относительно исходного уровня и контроля в среднем от 1,4 до 4,6 раза ($p < 0,001-0,002$), уровень ОАС в 1,6-5,4 раза ($p < 0,001$). У крыс в дозе 5 мг/кг уровень ОАС не имел достоверных отличий от показателя в контрольной группе в течение всего эксперимента.

Оценка содержания основных нейромедиаторов у экспериментальных животных на 90-й день эксперимента показала достоверное повышение глутамата и снижение ГАМК в сыворотке крови относительно исходного уровня и контроля, при этом изменение показателей имело дозозависимый характер. Повышение уровня глутамата установлено от 2 до 3,8 раза в зависимости от дозы ($p < 0,001$). Снижение ГАМК в сыворотке крови зарегистрировано в 2,3 раза-2,7 раза ($p < 0,001$). У крыс в дозе 5,0 мг/кг достоверного снижения анализируемых показателей в сыворотке крови относительно контроля не установлено.

Установлены морфологические изменения структуры тканей головного мозга, также имеющие зависимость от дозы водной суспензии нанодисперсного MnO. В наибольшей дозе (260 мг/кг массы тела/сутки) в коре больших полушарий и мозжечке выявлено резкое полнокровие сосудов с диапедезом эритроцитов и формированием очаговых кровоизлияний; субарахноидальные кровоизлияния, отёк головного мозга с расширением периваскулярных и перипеллюлярных пространств; очаги демиелинизации нервных волокон. В

дозе 50 мг/кг формируются очаговые расширения периваскулярных и перицеллюлярных пространств в слоях коры головного мозга с сохранением их дифференцировки, имеются очаговые субарахноидальные кровоизлияния и участки очаговой дистрофии нейронов. В дозе 10 мг/кг массы тела/сутки установлено незначительное расширение периваскулярных пространств. При экспозиции в дозе 5 мг/кг морфологическая картина тканей головного мозга и мозжечка соответствует контрольной группе и характеризуется сохранением рисунка строения во всех отделах.

Большая степень выраженности и распространенности патоморфологических изменений тканей внутренних органов выявлена при внутрижелудочном введении нанодисперсного MnO в дозе 10 мг/кг в течение 90 дней: в системе кровообращения (в виде гемодинамических расстройств с очаговым слабым и умеренным полнокровием сосудов и субарахноидальных кровоизлияний в головном мозге, печени, легких, почек, сердца), лимфатической (в виде слабо и умеренно выраженных периваскулярных лимфо-макрофагальных инфильтратов в ткани легких с переходом на прилежащие альвеолы) и макрофагальной (в виде активации альвеолярных макрофагов с образованием небольших скоплений в просветах альвеол) системах по сравнению с изменениями при введении микроразмерного аналога (в виде очагового полнокровия сосудов, субарахноидальных кровоизлияний в головном мозге, мелких очаговых лимфо-макрофагальных инфильтратов в легких, желудочно-кишечном тракте). Установлено расширение периваскулярных и перицеллюлярных пространств в головном мозге, слабо выраженные периваскулярный нежнноволокнистый кардиосклероз и очаговая белковая дистрофия гепатоцитов, не выявленные при введении микродисперсного аналога.

Исследование проникающей способности нанодисперсного NiO после 4-х часовой ингаляционной экспозиции в виде аэрозоля показало, что нанодисперсный NiO (в фактической концентрации NiO $1,34 \pm 0,07$ мг/дм³ и в абсолютной концентрации частиц 140194 ± 27768 ед./дм³) обладает большей проникающей способностью в 14-39 раз по сравнению с микродисперсным аналогом ($p = 0,0001$).

Заключение. Отличительные свойства физических параметров наночастиц, в том числе металлсодержащих (размер, удельная площадь поверхности, адсорбционная емкость, заряд частиц), потенциально увеличивают способность к проникновению через тканевые барьеры, реакционную и повреждающую способность. Настоящее исследование бионакопления и морфологических изменений тканей, выполненное на примере отдельных нанодисперсных оксидов металлов (MnO и NiO) показало, что металлсодержащие наночастицы при различных условиях экспозиции обладают высокой проникающей способностью и низкой эффективностью выведения из организма; профиль «критических» органов включает головной мозг, печень, селезенку, легкие; обуславливают морфофункциональные нарушения, имеющие дозозависимый характер, критических клеток и органов-мишеней. Большая степень выраженности морфологических изменений в системе

кровообращения, макрофагальной и лимфатической системах, а также наличие изменений в ткани печени, головного мозга и сердца, не выявленные при экспозиции микродисперсных аналогов, подтверждают большую повреждающую способность наночастиц и зависимость степени выраженности патологического процесса от размера частиц.

Полученные результаты экспериментальных исследований необходимо учитывать при разработке программ мониторинга и профилактики, направленных на снижение или устранение негативных последствий воздействия металлосодержащих наноматериалов и продукции на здоровье работающих и населения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Результаты анализа наноиндустрии в рамках ТС и ЕЭП (аналитический материал). – М., 2014. Режим доступа: <http://www.nanonewsnet.ru/news/2015/rezultaty-analiza-nanoindustrii-v-ramkakh-ts-eep> (Дата обращения: 15.08.2016).

2. Онищенко Г.Г. Стратегия безопасности в наноиндустрии / Г.Г. Онищенко //Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 4-8.

3. Безопасность наночастиц и наноматериалов для окружающей и производственной среды / А.И. Потапов, В.Н. Ракитский, А.В. Тулакин, В.Н. Ракитский и др. //Гигиена и санитария. – 2013. – № 3. – С. 8-14.

4. Комплексная медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: информационно-аналитическая и экспериментальная составляющие / В.А. Тутьельян, С.А. Хотимченко, И.В. Гмошинский, А.А. Шумакова и др. //Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С.15-18.

5. Основные результаты токсикологических экспериментов «ин виво» с некоторыми металлическими и металлооксидными наночастицами / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова, В.Б. Гурвич и др. //Токсикологический вестник. – 2015. – № 3. – С. 26-38.

6. Исследование острой токсичности аэрозоля нанодисперсного оксида марганца при ингаляционном поступлении / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, Т.И. Акафьева //Российские нанотехнологии. – 2015. – Т.10. – № 5-6. – С. 468-474.

7. Реакция глубоких дыхательных путей крысы на однократное интратрахеальное введения наночастиц оксидов никеля и марганца или их комбинации и её ослабление биопротекторной премедикацией / Б.А. Кацнельсон, И.А. Минигалиева, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова и др. // Токсикологический вестник. – 2014. – № 6. – С. 8-14.

8. Токсикологическая оценка наноразмерного коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном, в 92-дневном эксперименте на крысах. II. Морфология внутренних органов / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, А.А. Довбыш //Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № 1. – С. 47-55.

9. Биомаркеры ингаляционного воздействия наноразмерных аэрозолей / Е.В. Зибарев, М.В. Чащин, А.В. Кузьмин, С.М. Никонова //Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 21-23.

ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ В СОСТАВЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ АЭРОЗОЛЕЙ И ВЗВЕШЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

Зайцева Н. В.¹, Уланова Т. С.^{1,2}, Злобина А. В.¹, Волкова М. В.^{1,2}, Гилева М. И.¹

*¹ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками
здоровью населения» Роспотребнадзора,
Пермь, Россия*

*²ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»,
Пермь, Россия
E-mail: ulanova@fcrisk.ru*

Одним из актуальных направлений в деятельности Роспотребнадзора, связанных с ростом применения нанотехнологий в различных отраслях промышленности, является исследование условий труда на предприятиях, использующих производственные процессы с высоким риском вредного воздействия наноразмерных аэрозолей. Доказанным высоким риском характеризуются электродуговая сварка и резка металлов, пирометаллургические процессы, производство и применение лакокрасочных материалов, нанесение защитных нанопокровтий, газо-аэрозольные выхлопы дизельных двигателей.

Сотрудниками лаборатории методов анализа наноматериалов и мелкодисперсных частиц ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора с целью выявления, идентификации и оценки содержания наночастиц выполнены исследования ультрадисперсных аэрозолей в воздухе рабочей зоны различных производств [1, 2, 3]. Задачей исследования было сравнение содержания массовой концентрации взвешенных веществ и счетной концентрации наночастиц в воздухе рабочей зоны при различных видах производственных процессов.

Массовую концентрацию взвешенных веществ определяли в соответствии с МУК 4.1.2468-09 [4]. Визуализация частиц аэрозоля, собранного на фильтр АФА-ВП, проведена методом сканирующей электронной микроскопии с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ на сканирующем электронном микроскопе Tescan MIRA3. Проведена идентификация размеров наночастиц в воздухе рабочей зоны с использованием диффузионного аэрозольного спектрометра ДАС 2702 согласно ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 п. 6.3.4. [5], ГОСТ Р 8.755 – 2011 [6]. Диффузионный аэрозольный спектрометр сочетает в себе диффузионные батареи и конденсационный счетчик частиц. Возможности прибора включают определение суммарной счетной концентрации частиц в диапазоне от 3 до 200 нм, ширины распределения и спектра распределения по размерам в диапазоне от 3 до 200 нм. Спектр

распределения по способу расчета [6] является одномодальным и позволяет определить следующие параметры: счетная концентрация частиц в диапазоне максимума концентрации, частиц в см^3 ; диапазон размеров частиц, на который приходится максимум концентрации, в нм. Время измерения одного набора значений составляло 0,8 – 1,2 мин. Исследование одного производственного процесса занимало от 10 до 50 мин. Серии измеренных величин подвергали анализу на предмет исключений грубых погрешностей по статистическому критерию Граббса согласно ГОСТ Р 8.736 [7]. В случае динамического изменения величины счетной концентрации во времени, согласно изменению происходящих производственных процессов, величины концентраций в серии объединяли в несколько выборок с помощью критерия Граббса [7].

В связи с отсутствием гигиенического норматива оценки счетной концентрации наночастиц в воздухе рабочей зоны для сравнения использовали аналогичные по алгоритму исследования величины на рабочих местах административных сотрудников или инженерно-технических работников (ИТР) не участвующих в производственных процессах.

В 2013, 2015-2016 гг. обследованы предприятия горнодобывающей, резинотехнической и химической промышленности. В результате исследований воздуха рабочей зоны горнодобывающего предприятия получены принципиально различные характеристики взвешенных частиц: в подземных условиях труда – сравнительно большое число и массовая концентрация частиц руды с размерами от 0,5 до 3 мкм, счетная концентрация наночастиц не отличается от контроля; над землей: в процессе флотации – высокая счетная концентрация наночастиц и низкая массовая концентрация взвешенных веществ; в процессе гранулирования – максимальная счетная концентрация наночастиц выше контрольной в 19 – 26 раз; в процессе перегрузки продукта – максимальная счетная концентрация выше контрольной в 6 раз. Изменение размеров частиц, соответствующих максимумам концентрации, характеризуется небольшим разбросом от размеров частиц в контрольной точке и возможно требуется дополнительное микроскопическое исследование для точных выводов о природе и размерах частиц, характеризующих производственные процессы горнодобывающих производств.

Воздух рабочей зоны исследованных цехов предприятия резинотехнической промышленности содержит наночастицы в диапазоне от 5 до 200 нм. Отклонение размеров, соответствующих максимумам распределения, по сравнению с контролем (30-35 нм) составляло от 5 до 20 нм. По сравнению с контрольным рабочим местом достоверное превышение счетной концентрации частиц на рабочих местах варьировало от 4 до 11,2 раз.

Химическое производство характеризовалось более высоким уровнем счетной концентрации частиц в максимуме распределения на рабочем месте сравнения $10\ 683$ частиц в см^3 . При этом на трех из семи рабочих мест на производстве получены более низкие счетные концентрации, что согласуется с высокой влажностью на рабочих местах аппаратчика абсорбции, аппаратчика осаждения, аппаратчика подготовки сырья и отпуска полуфабрикатов и продукции.

Повышенные по сравнению с контролем значения счетной концентрации наночастиц получены на рабочем месте аппаратчика окисления 32 844 частиц в см³, в 3 раза, аппаратчика конденсации 48 544 частиц в см³, в 4,5 раза, аппаратчика производства химических реактивов 53 583 частиц в см³, в 5 раз. Размер частиц, соответствующий максимуму распределения, выше контроля на рабочих местах аппаратчика чешуирования и аппаратчика производства химических реактивов.

В результате выполненных исследований следует отметить, что воздух рабочей зоны аппаратчика производства химических реактивов характеризовался повышением значений, как счетной концентрации частиц, так и размера частиц. На рабочем месте аппаратчика конденсации преобладают частицы размера 0-5 нм, что возможно вследствие работы холодильного оборудования.

Таким образом, выполненные исследования могут быть использованы при оценке условий труда и профессионального риска при производственных процессах на производствах наноматериалов, а также производственных процессов с образованием наночастиц. Кроме того, представленные исследования позволяют ставить вопрос о проведении контроля содержания частиц нанодиапазона в воздухе рабочей зоны и разработке нормативов предельно допустимых концентраций для оценки риска здоровью рабочих, профилактике и лечению профессиональных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уланова Т.С. Результаты оценки показателей, характеризующих наночастиц в воздухе рабочей зоны титанового производства / Т.С. Уланова, А.В. Злобина, Д.А. Шекурова // Медицина труда и промышленная экология. – 2013. – №11. – С. 37-41.

2. Уланова Т.С. Определение частиц нанодиапазона в воздухе рабочей зоны металлургического производства / Т.С. Уланова, М.В. Антипьева, М.И. Забирова, М.В. Волкова // Анализ риска здоровью. – 2015. – № 1. – С. 77-80.

3. Уланова Т.С. Определение частиц микро- и нанодиапазона в воздухе рабочей зоны на предприятиях горнодобывающей промышленности / Т.С. Уланова, О.В. Гилева, М.В. Волкова // Анализ риска здоровью. – 2015. – № 4. – С. 44-48.

4. Измерение массовых концентраций пыли в воздухе рабочей зоны предприятий горнорудной и нерудной промышленности: МУК 4.1.2468-09. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.

5. Воздух рабочей зоны. Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании: ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007. – М.: Стандартинформ, 2012.

6. Государственная система обеспечения единства измерений. Дисперсный состав газовых сред. Определение размеров наночастиц методом диффузионной спектроскопии: ГОСТ Р 8.755-2011. – М.: Стандартинформ, 2012.

7. Государственная система обеспечения единства измерений. Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения: ГОСТ Р 8.736-2011. – М.: Стандартиформ, 2013.

УДК 613.31:628.162]-078

НАНОЧАСТИЦЫ ОДНОГО СОСТАВА, НО РАЗНОГО РАЗМЕРА ИНДУЦИРУЮТ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПО КАЧЕСТВЕННО РАЗНЫМ МЕХАНИЗМАМ

Ингель Ф. И.

*ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н.Сысина»
Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия
E-mail: fainaingel@mail.ru*

Сегодня можно считать доказанным, что экспозиция к наночастицам (НЧ) *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* сопровождается индукцией генотоксических эффектов. Среди большого количества публикаций на эту тему имеется несколько исследований, сообщающих о различиях в уровнях одних и тех же генетических повреждений при действии наночастиц одного состава и технологии изготовления, но разного размера. Однако остается открытым вопрос о том, протекает ли индукция генотоксических эффектов НЧ разного размера по единому механизму, что – на первый взгляд – представляется странным ввиду множественности известных механизмов токсического действия НЧ [1].

С использованием молекулярных методов установлено, что при различиях в механизмах индукции токсического действия НЧС разного размера, результирующие генотоксические эффекты могут быть если не идентичными, то качественно схожими [2-4]. В то же время, индукции качественно различных типов генетических повреждений, формирующих нестабильность генома, в зависимости от размеров частиц, до сих пор выявлено не было.

Материалы и методы. Цельную кровь человека инкубировали в присутствии цитохалазина В (микроядерный тест) с 0,005 – 5,0 мг/л НЧС размером $14,3 \pm 0,2$ нм (Ag14) и $100,0 \pm 11,0$ нм (Ag100), стабилизированных аравийской камедью. В качестве дополнительных контролей использовали ионы серебра в том же диапазоне концентраций и аравийскую камедь. Расширенный протокол цитомного анализа [5] включал оценку стандартных показателей – частоты 2-ядерных клеток с микроядрами (МЯ) и нуклеоплазменными мостами (НПМ), а также ряд дополнительных показателей – определение спектра клеточных популяций (по соотношению частот клеток с 1,2,3,4 и более ядрами), оценку частот каждого типа клеток с МЯ и НПМ,

определение степени асимметрии клеток, прошедших 2-й митоз, определение частот митоза и апоптоза, расчет объема пролиферативного пула и пр.

Результаты. Эффекты нестабильности генома, определенные по частоте делящихся клеток с МЯ и НПМ, также как торможение митотической активности и снижение объема пролиферативного пула изменялись в ряду Ag^+ >> Ag100 >> Ag14. И наоборот, повышение частоты асимметричных 3-ядерных клеток (анеуплоидия – эффект, лежащий в основе процесса опухолеобразования), оказалось наиболее характерным для культур, экспонированных к Ag14 и проявлялось в дозовой зависимости. Это наблюдение впервые доказывает возможность существования принципиально различных механизмов становления генетической нестабильности под действием наночастиц одного состава, но разного размера.

Прикладным результатом этого исследования следует считать доказательство того, что НЧС не могут быть использованы для обеззараживания питьевой воды, как это предполагалось ранее с учетом высокой бактерицидной активности наночастиц серебра (НЧС).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics / Th. Verano-Braga, R. Miethling-Graff, K. Wojdyla, A. Rogowska-Wrzesinska et al. /ACS Nano. – 2014. – Vol.8 (3). – P. 2161-2175.
2. Hay R.T. SUMO: a history of modification / R.T. Hay // Mol. Cell. – Vol. 18 (1). –1-12.
3. The Influence of Proteins on the Dispersability and Cell-Biological Activity of Silver Nanoparticles / S.C.G. Kittler, J.S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel et al. // J. Mater Chem. – 2009. – Vol.20. – P. 512-518.
4. Huang Chong-xin Protein Phosphatase 2A Mediates Oxidative Stress Induced Apoptosis in Osteoblasts / Huang Chong-xin, Lv Bo, Wang Yue //Mediators Inflamm. 2015. – Vol. 11. – Article ID 804260. – 8 p.
5. Electrochemically activated water induced effects of genomic instability in various living objects in vitro and in vivo / F. Ingel, O. Zatsepina, A. Stekhin, G. Yakovleva et al. // Occup. Med. Health Aff. – 2013. – Vol. 1. – Iss.7, 143. – P. 1-7.
6. Основные результаты токсикологических экспериментов <ин виво> с некоторыми металлическими и металло-оксидными наночастицами / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова, В.Б. Гурвич и др. // Токсикологический вестник. – 2015. – №3. – С. 26-40.

СОЧЕТАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОРАЗМЕРНОЙ УГОЛЬНОЙ ПЫЛИ И РАДИАЦИИ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ У ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кашанский С. В.¹, Ильдербаев О. З.², Чуленбаева Л. Е.²

¹*ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора,
Екатеринбург, Россия*

²*Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева,
Астана, Казахстан
E-mail: hlhdmrc@ymrc.ru*

В эксперименте на животных показано, что сочетанное воздействие наноразмерной угольной пыли и радиации вызывало гиперпродукцию продуктов липопероксидации с последующей депрессией антиоксидантной защиты.

Авторам представляется целесообразным продолжить исследования по изучению перекисного окисления липидов при комбинированном воздействии указанных факторов.

Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о важной роли активных форм кислорода (АФК) в развитии легочных повреждений, вызываемых тканевыми факторами, и, в частности, в профпатологии [1].

При взаимодействии фагоцитов с наноразмерными пылевыми частицами образование АФК может нарастать, так как эти частицы нечувствительны к АФК. Чрезмерная продукция АФК может приводить к повреждению собственных клеток, повреждению ядерных структур из-за окислительной модификации белков, липидов и нуклеиновых кислот [2].

Анализ литературы показал, что наноразмерные угольные частицы со средним диаметром 0,19 нм наиболее опасны для здоровья человека [3].

В работах, посвященных влиянию вредных производственных факторов на работающих на предприятиях энергетического комплекса, установлено, что митохондриальная дисфункция, характеризующаяся угнетением активности ферментов дыхательной цепи, запускает структурно-морфологические и метаболические нарушения, возникающие в результате гипоксического воздействия фактора. В результате этого развиваются дистрофические изменения органов и тканей, приводящие в конечном итоге к формированию профессиональных заболеваний органов дыхания [4].

Учитывая важность окислительно-метаболических процессов в формировании патологических процессов, их лабильность, высокую чувствительность, а также значительные последствия при их повреждении, нам представляется интересной их роль в развитии патологических изменений у животных при сочетанном воздействии преимущественно наноразмерной угольной пыли и сублетальной дозы радиации. Поэтому целью нашей работы

было изучение роли свободнорадикального окисления в тканях надпочечников, иммунокомпетентных органах и клетках при комбинированном воздействии сублетальной дозы гамма-излучения и наноразмерной угольно-породной пыли в эксперименте.

Для реализации поставленной цели проведены 4 серии опытов на 40 белых крысах-самцах весом 200-250 г. Животные делились на 4 группы: I группа – интактная, II группа – крысы, ингалированные наноразмерной угольно-породной пылью в средней концентрации 50 мг/м^3 в пылевой камере ежедневно (по 4 часа) в течение 12 недель, III группа подвергалась гамма облучению в дозе 6 Гр, и IV группа – комбинированному воздействию угольной пыли и гамма облучению. Для воспроизведения экспериментального антракоза у подопытных крыс использовали специальную ингаляционную затравочную камеру.

Животных III и IV группы облучали за 90 суток до исследования на радиотерапевтической установке TERAGAM Co^{60} однократно по 0,2 Гр. У животных определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) в различных органах и клетках. Для исследования выделяли лимфоциты из периферической крови и готовили гомогенаты из печени, селезенки, тимуса, лимфатических узлов тонкого кишечника и надпочечников. В них определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Полученные результаты исследования обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики с вычислением критериев Стьюдента.

Как показали проведенные исследования при воздействии частиц угольной пыли концентрация ДК увеличивается в лимфоцитах периферической крови с $0,28 \pm 0,02$ до $0,35 \pm 0,02$ ($p < 0,05$) и в тимусе с $0,48 \pm 0,04$ до $1,02 \pm 0,14$ ($p < 0,05$). После облучения у животных уровень ДК в лимфоцитах крови и тимусе не изменялся ($p > 0,05$). У подопытных животных после пыле-радиационного воздействия концентрация ДК в лимфоцитах периферической крови 1,2 раза превышала ($p < 0,001$), а в тимусе оставалось на уровне контрольных величин, но наблюдалась некоторая тенденция к повышению на 8,33 % ($p > 0,05$).

Концентрация ДК в лимфатических узлах тонкого кишечника у животных II группы, подвергавшихся запылению, увеличивалась с $0,36 \pm 0,03$ до $1,11 \pm 0,10$ или в 3,08 раза ($p < 0,001$), а в IV группе до $0,66 \pm 0,05$ или в 1,83 раза ($p < 0,001$). В гомогенатах печени у запыленных животных отмечено достоверное увеличение ДК на 75,0 % ($p < 0,05$), тогда как при воздействии угольно-радиационного фактора количество ДК увеличилось с $0,68 \pm 0,05$ до $0,84 \pm 0,06$ или на 23,52% ($p < 0,05$). Во второй и третьей группе со стороны надпочечников существенных изменений не наблюдалось, а у животных IV группы отмечено снижение количества диеновых конъюгатов в 2,41 раза ($p < 0,001$). В селезенке во всех группах уровень ДК практически оставался на одном уровне.

Выявлена значительная интенсивность процессов липопероксидации в исследуемых объектах с помощью МДА у крыс, подвергавшихся воздействию наноразмерных частиц угольной пыли, гамма-радиации и их комбинации. При воздействии частиц угольной пыли в лимфоцитах периферической крови

содержание МДА повышалось на 50,0 % ($p < 0,05$). Ответ на гамма-излучение в дозе 0,2 Гр уровень МДА оставался на уровне контрольной группы ($p > 0,05$).

При воздействии частиц угольной пыли в гомогенате печени отмечено увеличение уровня МДА на 38,46 % ($p < 0,05$), при комбинированном воздействии – на 69,23 % ($p < 0,01$), тогда как при изолированном действии гамма-радиации – незначительное увеличение уровня МДА.

В остальных группах животных выявлено стабильное повышение содержания МДА. Так у животных при воздействии только наноразмерной угольной пыли концентрация МДА в лимфатических узлах тонкого кишечника повышалась на 60,0 % ($p < 0,05$), при воздействии гамма-излучением – на 40,0% ($p < 0,05$), а при комбинированном воздействии (IV группа) поднималась на 80 % ($p < 0,05$). В гомогенате тимуса наблюдалось усиление активации процессов ПОЛ, что выражалось в более высоком содержании МДА по сравнению с контрольной группой. Концентрация МДА во II группе увеличилась на 38,9 % ($p < 0,05$), в III группе – на 11,1 % ($p > 0,05$), а в IV группе возросла на 61,1 % ($p < 0,01$).

Аналогичная динамика отмечалась и в гомогенате надпочечников: во II группе увеличена на 36,4 % ($p < 0,05$), в III группе – на 13,6 % ($p > 0,05$), в IV группе – на 77,3 % ($p < 0,05$). Окислительный стресс является одним из важных патогенетических звеньев многих заболеваний (в т. ч. и профессиональных), при которых активные формы кислорода проявляют свое токсическое действие в связи с их интенсивной генерацией и истощением антиоксидантной защиты. Доказано значение активации окислительного метаболизма и истощения системы АОЗ в патогенезе кониотического воспаления, раннего развития пневмокониоза и в постконтактном периоде [5].

Проведенные нами исследования выявили активацию процессов перекисного окисления липидов в органах экспериментальных животных, что выражалось в достоверном увеличении содержания МДА и ДК. Выявленные изменения свидетельствуют о наличии дисбаланса оксидантно-антиоксидантной системы в иммунокомпетентных органах у крыс, подвергавшихся воздействию радиационного и нерадиационного факторов, при этом статистически значимо более выраженного у животных подвергавшие комбинированному воздействию этих факторов.

Авторам представляется несомненной актуальность продолжения исследований, посвященных изучению комбинированного воздействия радиационных и нерадиационных факторов на общественное здоровье и проведение мероприятий по ликвидации отрицательных эффектов воздействия на население.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Величковский Б.Т. Новые представления о патогенезе профессиональных заболеваний легких пылевой этиологии // Пульмонология. – 1995. - № 1. – С. 6-16.
2. Уфимцева Л.В., Антипова Н.С., Кольцова Е.Е. Распределение наночастиц пыли в воздухе селитебной территории хабаровска под влиянием

атмосферных осадков // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. Медицина и здравоохранение. – 2015. - № 5. – С. 50-53.

3. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Успехи современной биологии. – 1993. – Том 113, № 1. – С. 71-81.

4. Фоменко Д.В., Горохова Л.Г., Панев Н.И. Клинико-экспериментальные исследования метаболического ответа организма на хроническое воздействие угольно-породной пыли // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. - № 2. – С. 15-21.

5. Cheresh P., Kim S.-J., Tulasiram S., Kamp D.W. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. Biochimica et Biophysica Acta. – 2013. – Volume 1832, № 7. – P. 1028-1040.

УДК 615.9

**НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ЧАСТНЫЕ
ОСОБЕННОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТОКСИЧНОСТИ
МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ
(ЭКСПЕРИМЕНТЫ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ)**

**Минигалиева И. А.¹, Кацнельсон Б. А.¹, Привалова Л. И.¹,
Сутункова М. П.¹, Валамина И. Е.², Шур В. Я.³, Шишкина Е. В.³,
Макеев О. Г.³, Вараксин А. Н.⁴, Панов В. Г.⁴**

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья
рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора,
Екатеринбург, Россия

²Центральная научно-исследовательская лаборатория Уральского государственного
медицинского университета,
Екатеринбург, Россия

³Уральский центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии»,
Уральский федеральный университет,

⁴ФБУН Институт промышленной экологии УрО РАН
Екатеринбург, Россия
E-mail: ilzira@ymrc.ru

Чем более широким становится внедрение наноматериалов в различные сферы промышленности, науки и медицины, тем выше вероятность того, что человек оказывается под комбинированным воздействием этих материалов, а там, где наночастицы давно образуются как побочный продукт той или иной технологии, комбинированная экспозиция возникает почти неизбежно. Типичным примером являются наночастицы оксидов многих металлов и металлоидов, составляющие существенную фракцию дисперсного состава аэрозолей конденсации, образующихся при электродуговой сварке, пирометаллургических и некоторых химических технологиях, наряду как с микрометровыми частицами, так и с частицами субмикронных размеров, превышающих условную верхнюю границу нанометрового диапазона (100 нм).

Такие аэрозоли имеют разный (в зависимости от конкретного технологического процесса, его стадии, состава выплавляемых или свариваемых сплавов, сварочных электродов и т.п.), но, как правило, многокомпонентный химический состав. Однако литературные данные о закономерностях комбинированной токсичности металлосодержащих наночастиц крайне малочисленны.

В серии субхронических (путём повторных внутрибрюшинных инъекций) и острых (путём однократной интратрахеальной инстилляцией) экспериментов на крысах мы сопоставили токсичность наночастиц NiO, Mn₃O₄, CuO, PbO и ZnO при действии изолированно, в различных бинарных и в одной трёхфакторной (CuO, PbO, ZnO) комбинации. Токсические эффекты оценивались по большому числу функциональных, биохимических, морфометрических и токсикокинетических критериев. Математическое моделирование комбинированного действия на базе получаемых экспериментальных данных осуществлялось с помощью изоболограмм на основе построения поверхности отклика (Response Surface Methodology).

Показано, что основные закономерности комбинированного действия токсичных металлов в форме наночастиц их оксидов являются принципиально теми же, что и для действия их растворимых солей, изученного нами ранее. При этом комбинированная токсичность одной и той же пары наночастиц типологически не однозначна, а зависит от того, по какому эффекту она оценивается, и от дозозависимого уровня этого эффекта. Присоединение третьего компонента может в ту или иную сторону существенно изменить тип комбинированной токсичности двух других, делая её риск выше или ниже ожидаемого.

УДК 57

НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОРАЗМЕРНЫХ АЭРОЗОЛЕЙ

Мошкин М. П.

*Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН
Федеральный ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных»,
Новосибирск, Россия
E-mail: mmp@bionet.nsc.ru*

Актуальность биологического и биомедицинского изучения субмикронных и наноразмерных аэрозолей определяется: (а) их потенциальной токсичностью, (б) возможностью создания новых диагностических маркеров, (в) перспективами применения в качестве средств адресной доставки терапевтических агентов.

Для изучения динамики внутримозгового накопления/выведения наночастиц (НЧ), которые интраназально апплицировали мышам, были

использованы магнито-контрастные НЧ Mn_2O_3 , детектируемые методом магнитно-резонансной томографии (МРТ). Кинетические расчеты на основе кумулятивных функций распределения Вейбула показали, что динамика накопления и выведения НЧ определяются разными процессами. При этом время достижения максимума варьировало для структур мозга от 12 до 170 ч и положительно коррелировало с числом синаптических передач, через которые проходили НЧ. Электронная микроскопия ткани мозга, взятой у мышей после интраназального введения обладающих высокой электронной плотностью НЧ оксида платины, позволила доказать, что при таком способе введения НЧ накапливаются исключительно во внутриклеточном пространстве. Этот результат ставит вопрос о взаимодействии НЧ с внутриклеточными белками. Протеомный анализ белков, обогащаемых при инкубации цитоплазмы с различными НЧ, показал, что к ним относятся внутренне дезорганизованные протеины, которые, как известно, участвуют в формировании стресс-гранул, провоцирующих нейродегенеративные заболевания.

Потенциальную опасность, связанную с поступлением НЧ в мозг, частично, компенсирует конгруэнтность неодинакового осаждения и захвата НЧ на поверхности обонятельного эпителия (ОЭ). Окончания обонятельных рецепторов в дорзальном отделе ОЭ, который подвергается наибольшей «бомбардировке» НЧ, характеризуются меньшей способностью к захвату наноразмерных объектов по сравнению с вентральным отделом ОЭ. Еще более эффективная аэродинамическая защита мозга от НЧ была выявлена при сравнении мышей и роющих почву передними зубами обыкновенных слепушонок. У последних число осажденных НЧ на единицу поверхности ОЭ было в 6 раз меньше, чем у мышей.

Потенциальные нейробиологические риски взаимодействия организма с наноразмерными аэрозолями не ограничиваются их накоплением в структурах мозга. В экспериментах на мышах было установлено, что НЧ некоторых оксидов металлов, обладающие свойствами протонных губок, вызывают падение температуры тела на $5-6^{\circ}C$ в первые полтора часа после интраназальной аппликации. Механизм гипотермического действия связан с закислением внутриклеточной среды клеток обонятельного эпителия, что приводит к каскаду реакций, итогом которых является снижение установочной точки в центре терморегуляции.

Таким образом, осаждение НЧ в носовой полости дает начало комплексу нейробиологических процессов, чья патогенетическая значимость требует детального изучения, в том числе и с использованием генетических линий животных, предрасположенных к нейродегенеративным патологиям, частота которых, как следует из токсикологических работ, прямо зависит от содержания в воздухе наноразмерных аэрозолей.

О ПРИНЦИПАХ И СПОСОБАХ ПОВЫШЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА К ВРЕДНЫМ ЭФФЕКТАМ МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ

**Привалова Л. И.¹, Кацнельсон Б. А.¹, Гурвич В. Б.¹, Минигалиева И. А.¹,
Сутункова М. П.¹, Григорьева Е. В.¹, Макеев О. Г.²,
Валамина И. Е.², Шур В. Я.³, Шишкина Е. В.³**

¹*ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья
рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора,
Екатеринбург, Россия*

²*ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, Минздрава России
Екатеринбург, Россия*

³*Уральский центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии»,
ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
Екатеринбург, Россия
E-mail: privalova@umrc.ru*

Высокий уровень биологической агрессивности многих металлических и металло-оксидных наночастиц требует не только снижения экспозиции к ним, насколько это технически возможно, но и поиска способов биологической профилактики, под которой мы понимаем повышение устойчивости организма к действию вредных факторов среды обитания и условий труда.

При субхронических интоксикациях крыс, вызванных повторным внутрибрюшинным введением наночастиц серебра, оксида меди, комбинации оксидов никеля и марганца, комбинации оксидов свинца, меди и цинка, а также при однократном интратрахеальном введении перечисленных комбинаций мы показали, что на фоне приёма комплексов некоторых биологически активных веществ в безвредных дозах местная и системная токсичность таких наночастиц, включая их генотоксичность, могут быть существенно ослаблены. Состав этих комплексов обосновывается теоретически и с учётом накопленного опыта аналогичных экспериментов с токсичными металлами в ионно-молекулярной форме.

Многолетний положительный опыт организации вначале выборочных (контролируемых), а затем широких курсов биологической профилактики неблагоприятных эффектов других вредных экспозиций (профессиональных или экологически обусловленных) позволяет ожидать, что этот инструмент снижения риска, может быть, осуществим и полезен также в сфере нанотехнологий.

Способы биопрофилактики вредных эффектов действия наночастиц серебра, оксида меди и комбинации оксидов никеля и марганца признаны изобретениями и защищены патентами Российской Федерации.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МАРГАНЦА (II, III) И ОКСИДА НИКЕЛЯ (II) НА КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

**Проценко Д. А.¹, Дорофеева Н. В.^{1,2}, Шамбатов М. А.¹,
Мелехин В. В.¹, Макеев О. Г.¹**

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ,
Екатеринбург, Россия

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени
первого Президента России Б. Н. Ельцина»,
Екатеринбург, Россия
E-mail: dorofeeva.nadin@gmail.com

Несмотря на то, что наночастицы в мире уже используются более 10 лет, ни один вид частиц не был изучен на безопасность в полном объеме. В связи с этим, а также неприменимостью традиционного подхода для оценки токсичности, ведущие международные организации рекомендуют использование клеточных культур человека для исследования токсичности наночастиц *in vitro* [1].

Материалы и методы. В работе были использованы линии культивируемых фибробластов человека, 4-7 пассаж. Клетки культивировали по оригинальной методике [2].

Для построения кривой роста интактных фибробластов через 3 суток произведён подсчёт количества клеток с помощью камеры Фукса-Розенталя. Повторный отбор образцов производился каждые 3 дня.

Для анализа возможного цитотоксического эффекта наночастиц диаметром 30-60 нм, полученные методом лазерной абляции в Уральском Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» УРФУ, был произведён посев клеток. На 9 сутки вносили суспензию наночастиц в концентрации 0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл и клетки инкубировали со сменой среды и подсчётом количества клеток каждые 3 дня. По полученным данным строили кривые «количество клеток / дни культивирования» в сравнении с кривой роста интактных фибробластов.

Изменения в митохондриальной активности клеток после были определены с использованием МТТ-метода. МТТ тест проводили по стандартной методике [3] с использованием тест – системы TOX1 (Sigma Aldrich) в соответствии с рекомендациями производителя.

Оценку результатов теста проводили путём определения индекса цитотоксичности (IC) по формуле:

$$IC = \left(1 - \frac{OP_o}{OP_k}\right) \times 100\% [7],$$

Где:

OP_к – оптическая плотность раствора контрольной группы,

OP_о – оптическая плотность раствора опытной группы. Индекс цитотоксичности – это показатель ингибирования, который рассчитывается как процент нежизнеспособных клеток в культуре.

Через 12 суток после начала эксперимента провели морфологическое исследование клеток после введения наночастиц с предварительным окрашиванием по методу Романовского.

Для оценки значимости различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. При вероятности ошибки $p < 0,05$ различия между средними значениями считались достоверными.

Результаты и их обсуждение. Из полученных данных следует, что после введения суспензии наночастиц оксида марганца в концентрации 0,01 мг/мл уже на 3-и сутки произошло снижение количества клеток по сравнению с контролем. Значимое падение числа клеток наблюдалось после введения суспензии наночастиц в концентрации 0,05 мг/мл. Наибольшую цитотоксичность проявили наночастицы марганца в концентрации 0,1 мг/мл. На 6-е сутки число клеток сократилось в 2,5-4 раза, что, по-видимому, связано с преобладанием процессов апоптоза и некроза над процессами митоза. Наблюдались единичные прикреплённые клетки с сильно вакуолизированной цитоплазмой. На 9-е сутки культура полностью погибла (рисунок 1).

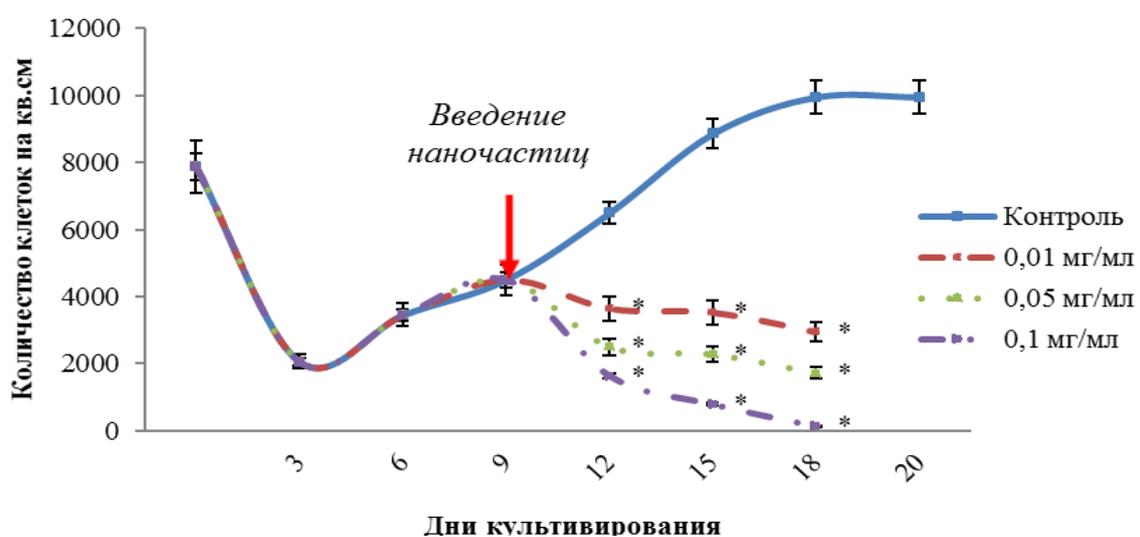


Рисунок 1. Клеточная плотность культуры фибробластов после введения наночастиц оксида марганца
* - различия с контролем достоверно ($p < 0,05$)

После введения суспензии наночастиц никеля в концентрациях 0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл наблюдается уменьшение количества клеток уже на 3-и сутки эксперимента. Наибольшую цитотоксичность проявили наночастицы никеля в концентрации 0,1 мг/мл. На 6-е сутки число клеток уменьшилось в 4-5 раз по сравнению с контролем и культуры полностью погибли (рисунок 2).

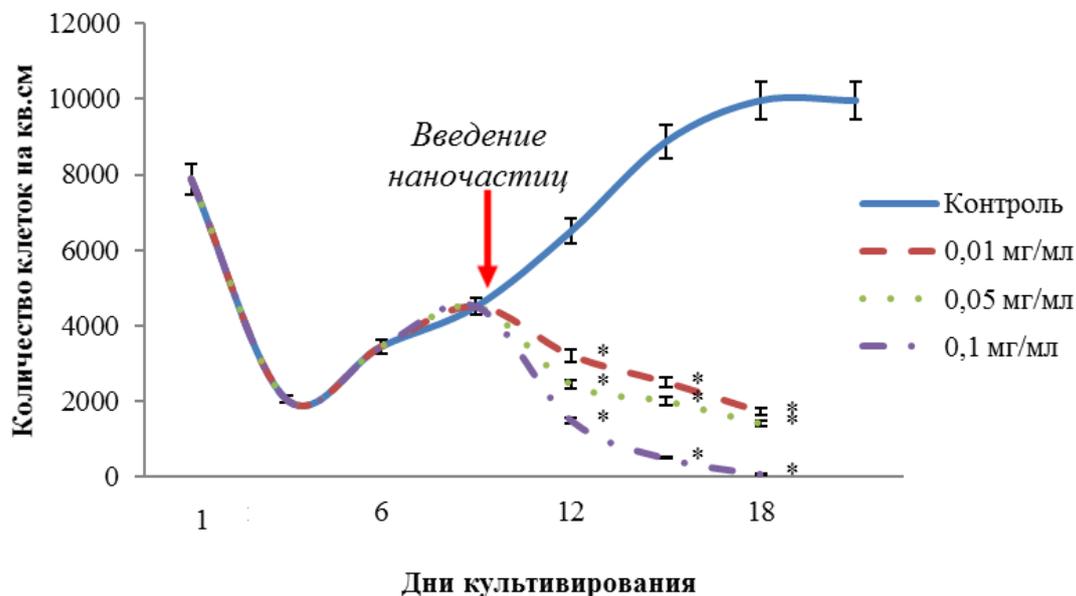


Рисунок 2. Клеточная плотность культуры фибробластов после введения наночастиц оксида никеля
* - различия с контролем достоверно ($p < 0,05$)

По данным МТТ – теста большой цитотоксический эффект на клеточную культуру фибробластов человека оказало добавление наночастиц оксида никеля (II) по сравнению с добавлением наночастиц оксида марганца (II, III), что проявилось в виде снижения митохондриальной активности (рисунок 3).

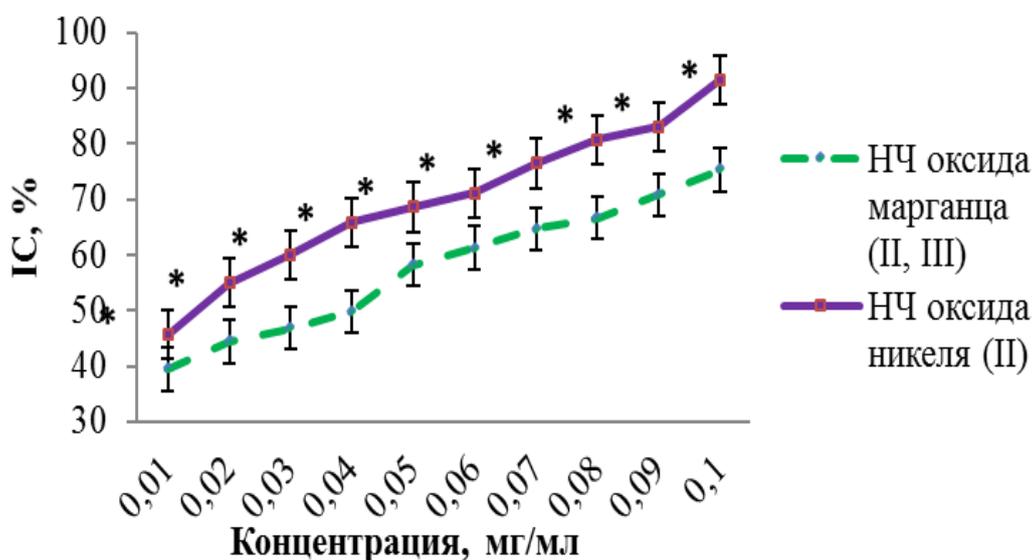


Рисунок 3. График зависимости IC от концентрации наночастиц полученный с помощью МТТ-теста

Из полученных результатов следует, что действие тестируемых типов наночастиц сопряжено с ингибированием митохондриальных дегидрогеназ, в т.ч. NADH-дегидрогеназы, которая играет ключевую роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования.

На основании морфологического анализа было установлено, что наночастицы обладают высокой токсичностью, способны проникать через клеточные барьеры, токсичность наночастиц определяется их формой и размерами, прослеживается выраженный дозозависимый эффект.

Выводы

1. Наночастицы марганца и никеля в концентрациях 0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл обладают выраженной цитотоксичностью.

2. Наибольшую цитотоксичность проявили наночастицы никеля в концентрации 0,1 мг/мл.

3. С увеличением концентрации наночастиц оксида марганца и никеля, по сравнению с контрольной группой, ускоряется процесс дифференцировки фибробластического дифферона с последующей их гибелью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева М. С., Макеев О. Г., Коротков А. В. Методология оценки токсичности наночастиц // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. - № 3. – С. 62-64.

2. Макеев О. Г., Улыбин А. И., Зубанов П. С. Патент № 2345781 «Способ получения культуры клеток кожи» // Бюллетень изобретений. – 2009. - № 4.

3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // J. Immunol. Meth. – 1983. – V. 65, № 1–2. – P. 55–63.

УДК [615.46.014.47:615.28]:546.26

ЭФФЕКТИВНЫЕ И БЕЗОПАСНЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ МЕДИЦИНСКОГО И ВЕТЕРИНАРНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ НАНОГЛОБУЛЯРНОГО УГЛЕРОДА

Пьянова Л. Г.^{1,2}, Седанова А. В.¹, Лихолобов В. А.^{1,2}

¹ФГБУН Институт проблем переработки углеводов Сибирского отделения РАН,
Омск, Россия

²ФГБОУ ВО «Омский государственный технический университет»,
Омск, Россия

E-mail: medugli@ihcp.ru

В настоящее время существует широкий ассортимент лекарственных средств и медицинских изделий, отличающиеся по типу воздействия, эффективности, показаниям. Немаловажную роль играет и их стоимость.

Но разработка новых, более эффективных и безопасных препаратов (лекарственных средств, изделий медицинского назначения) весьма актуальна.

Требования к безопасности и качеству разрабатываемых препаратов устанавливаются на этапах их разработки, производства с применением материалов, соответствующих требованиям медицины. Требования к качеству оцениваются по нормам, регламентируемым стандартами или техническим условиям.

Безопасность применения определяется отсутствием следующих вредных факторов: травматического воздействия на организм (механического, теплового, химического и др.); выделения вредных для организма веществ, в том числе токсических, аллергических, канцерогенных, мутагенных и т. п.; специфических побочных эффектов и противопоказаний, связанных с особенностями свойств конкретных лекарств; лекарственной зависимости, синдрома отмены лекарственного средства.

Вопросы экологической безопасности лекарств и изделий рассматриваются при их изготовлении, транспортировании, хранении, переработке, потреблении и утилизации.

В Институте проблем переработки углеводов СО РАН разработаны технологические подходы к целенаправленному синтезу нового класса пористых углерод-углеродных материалов на основе наноглобулярного дисперсного углерода (диаметр частиц 40-60 нм) и на их базе сорбентов медицинского назначения: гемосорбента углеродного в физиологическом растворе стерильного ВНИИТУ-1 и энтеросорбента углеродного ВНИИТУ-2. Синтез основан на двухстадийном переходе углерода в нанодисперсные углеродные частицы и пироуглерод.

К сорбентам медицинского и ветеринарного назначения, непосредственно контактирующим с биологической жидкостью организма, предъявляются особые требования к качеству: высокая степень химической чистоты, минимальное содержание примесей, нетоксичность, большая механическая прочность и гладкий рельеф поверхности гранул, отсутствие пылеобразования (выделения ультрадисперсных частиц), высокая сорбционная емкость по отношению к удаляемым веществам, биосовместимость и др. Разработанные материалы на основе наноглобулярного углерода являются безопасными и эффективными.

В настоящее время актуальной задачей является создание биоспецифических сорбентов с повышенной адсорбционной активностью по отношению к токсическим веществам, в том числе белковой природы, накапливающимся при определенных заболеваниях (онкологические, иммунные, инфекционные и др.). Это достигается путем химического модифицирования углеродной поверхности органическими кислотами, ферментами, белками и др. Наибольший интерес для модифицирования углеродной поверхности представляют органические вещества, имеющие в своей структуре азот- и кислородсодержащие группы (карбокисильные, амидные, аминные и т. д.).

Углеродные сорбенты являются перспективными материалами (носителями) для модифицирования с целью разработки и получения лекарственных средств, как для медицины, так и для ветеринарии. Разработанные в ИППУ СО РАН методы химической функционализации поверхности углеродных сорбентов кислород- и азотсодержащими модификаторами позволяют получить широкий спектр эффективных сорбционных материалов для медицины, избирательно поглощающих патологические соединения белковой природы (провоспалительные цитокины, вирусные частицы гепатитов, продукты вирусов и бактерий и т.д.).

Для ветеринарии наиболее перспективными представляют собой разработки углеродных энтеросорбентов комплексного действия, содержащие биологически активные вещества. Действие таких препаратов позволит проводить коррекцию различных патологий иммунной системы, обмена веществ желудочно-кишечного тракта, повысить естественную и специфическую резистентность организма, стимулировать рост и продуктивность животных и птиц.

Одно из направлений исследований, развиваемых в последние годы в ИППУ СО РАН – синтез формованных углеродных сорбентов для аппликационной медицины, исследование их физико-химических и медико-биологических свойств.

Разработанные в ИППУ СО РАН углеродные сорбционные материалы широко применяются в медицинской и ветеринарной практике. В докладе будут представлены основные направления по разработке углеродных сорбентов медицинского и ветеринарного назначения, результаты физико-химических и медико-биологических исследований, подтверждающих их эффективность и безопасность.

УДК 613.6:614.71:615.9

ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ ГИГИЕНИЧЕСКИЕ НОРМАТИВЫ АЭРОЗОЛЕЙ НАНОЧАСТИЦ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И УПРЕЖДАЮЩАЯ ОЦЕНКА РИСКА

Радилов А. С., Глушкова А. В., Дулов С. А., Рембовский В. Р.

*ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии
и экологии человека» ФМБА России,*

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: gpech@fmbamail.ru, niigpech@rihophe.ru

Как известно, вероятность негативных последствий воздействия наночастиц для окружающей среды и здоровья населения определяется потенциальной опасностью, одной из характеристик которой является токсичность вещества или комплекса веществ, входящих в состав материала, который взаимодействует с живыми организмами [1].

Токсичность многих известных наночастиц в ряде случаев значительно превышает токсичность известных микро- и макрочастиц [2, 3, 4].

В соответствии с вариантом проявления токсичности при соответствующих путях введения, нами предлагаются коэффициенты запаса. В основу предлагаемых коэффициентов положена идея биодоступности наночастиц в зависимости от пути поступления. При этом следует учитывать, что независимо от класса опасности изучаемого вещества, при одинаковых (идентичных) показателях токсичности при внутрижелудочном и внутрибрюшинном путях введения, вещество будет обладать низкой биодоступностью и соответственно коэффициент запаса будет равен 1.

Данные коэффициенты запаса, представленные в таблице 1, могут быть использованы при расчете и обосновании гигиенических нормативов, а также оценке влияния наноаэрозолей на здоровье персонала.

Таблица 1- Определение коэффициента запаса в соответствии с вариантом проявления токсичности

№ варианта	Соотношение токсичности нано- и микрочастиц при соответствующих путях введения			Коэффициент запаса
	в/ж	в/б	интратрахеально/ ингаляционно	
1	$T_n \cong T_m \geq 5 \text{ г/кг}$	$T_n \leq T_m$	$T_n \cong T_m$	1
2	$T_n \cong T_m$	$T_n > T_m$	$T_n \geq T_m$	10
3	$T_n > T_m$	$T_n > T_m$	$T_n > T_m$	50

Примечание: T_n – токсичность наночастиц
 T_m – токсичность микрочастиц того же вещества
 \cong – знак приблизительно равно

В качестве основы для расчета ориентировочных гигиенических нормативов НЧ в воздухе рабочей зоны предлагается использовать формулы для расчета ПДК аэрозолей металлов, приведенных в [5] и [6]:

$$(1) \text{ ПДК}_{\text{рз}} (\text{мг/м}^3) = 0,0008 \times \text{DL} 50 (\text{мг/кг}) [4]$$

и для аэрозолей окислов и других соединений металлов:

$$(2) \log \text{ПДК} (\text{мг/м}^3) = 0,85 \log \text{LD} 50 (\text{мг/кг}) - 3,0 + \log M - \log N [4,5]$$

Где:

LD_{50} – смертельная доза для 50% мышей при внутрибрюшинном введении и недельном периоде наблюдения, выраженная в миллиатомах на килограмм веса;

N – число атомов металла в молекуле вещества;

M – молекулярный вес.

Для расчета ПДКр.з. для наночастиц предлагается использовать предлагаемые уравнения (формулы 1 и 2) с учетом коэффициента запаса (таблица 1).

Известно, что при наличии экспериментально подтвержденных величин LD₅₀ вещества при различных путях введения используются минимальные значения LD₅₀, исходя из максимально неблагоприятного прогноза и выбора соответствующего коэффициента запаса.

Пример расчета ориентировочного гигиенического регламента для наночастиц меди:

$$LD_{50} \text{ нано частиц меди} = 413 \text{ мг/кг}$$

$$ПДК_{рз} \text{ НЧ меди} = \frac{0,0008 \times 413}{50} = 0,007 \text{ мг/м}^3$$

Прогнозируемые величины ПДК и показатели риска в воздухе рабочей зоны для некоторых наноаэрозолей рассчитаны нами с учетом предлагаемых подходов и представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Прогнозируемые величины ПДК для некоторых нано- и микроаэрозолей

Вещество	Животные/ путь введения	LD ₅₀ (мг/кг) НЧ	LD ₅₀ (мг/кг) МЧ	ПДКр.з. (мг/м ³) МЧ	Прогнозируе мая ПДКр.з. НЧ (мг/м ³)
Ag	крысы интраперитонеально	5000 [8]	не достигнута	1 [7]	0,08
Cu	крысы внутрижелудочно	413 [9]	5000 [12]	1 [7]	0,007
TiO ₂	крысы внутрижелудочно	12000 [10]	не достигнута	10 [7]	0,19
Fe ₂ O ₃	крысы перорально	310 [11]	98,6 г/кг [13]	6 [7]	0,005

Таким образом, алгоритм экспресс-нормирования наночастиц и наноаэрозолей в воздухе рабочей зоны выглядит следующим образом:

1. Оценка сравнительной токсичности наночастиц и микрочастиц.
2. Выбор коэффициента запаса с учетом имеющихся сравнительных экспериментальных данных по токсичности наночастиц и микрочастиц.
3. Расчет прогнозируемой величины ПДКрз для наночастиц с использованием стандартной формулы и учетом коэффициента запаса.

Предлагаемые подходы к расчету ориентировочных гигиенических нормативов аэрозолей наночастиц в воздухе рабочей зоны позволяют получить значения показателей опасности НЧ и на основе этих данных в упреждающем режиме провести оценку риска здоровья персонала на предприятиях nanoиндустрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Su C. Environmental implications and applications of engineered nanoscale magnetite and its hybrid nanocomposites: A review of recent literature / C. Su <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Su%20C%5Bauthor%5D&cauthor=true&cauthoruid=27477792> // J. Hazard Mater. – 2016.
2. Morimoto Y. Evaluation of Pulmonary Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles Following Inhalation and Intratracheal Instillation / Y. Morimoto, H. Izumi et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17(1241). – P. 1-16.
3. Theodorou I.G. Effect of pulmonary surfactant on the dissolution, stability and uptake of zinc oxide nanowires by human respiratory epithelial cells. / I.G. Theodorou, P. Ruenraroengsak et al. // Nanotoxicology. – 2016. – Vol. 21. – P.1-37.
4. Minetto D. Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C₆₀ engineered nanoparticles: An overview / D. Minetto, A. Volpi Ghirardini, G. Libralato // Environ. Int. – 2016. – Vol. 92-93. – P. 189-201.
5. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия вредных веществ в воздухе рабочей зоны: МУ 4000-85. – М., 1985.
6. Проблемы промышленной токсикологии: Сборник / Под ред. Ф.Калояновой-Симеоновой, И.В. Саноцкого: Постоян. комис. по сотрудничеству в области здравоохранения. – М.: СЭВ 1982. – 92 с.
7. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны: ГН 2.2.5.1313-03.
8. Tao W. Influence of silver nanoparticles on heavy metals of pore water in contaminated river sediments / W. Tao, G. Chen et al. // Chemosphere. – 2016. – Vol. 162. – P. 117-124.
9. Lee I.C. Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats / I.C. Lee, J.W. Ko et al. // Int. J. Nanomedicine. – 2016. – Vol. 11. – P. 2883-2900.
10. Li M. Arsenate accumulation, distribution, and toxicity associated with titanium dioxide nanoparticles in *Daphnia magna* / M. Li, Z. Luo et al. // Environ. Sci. Technol. – 2016. – Abstract.
11. Sadeghi L. Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue / L. Sadeghi, V. Babadi et al. // Bratisl. Lek. Listy. – 2015. – Vol. 116(6). – P. 373-378.
12. Han X. Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in *Drosophila* and their microbiomes / X. Han, B. Geller et al. // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 487. – P. 822-829.
13. Hinderliter P.M. A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. / P.M. Hinderliter, K.R. Minard et al. // Part Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 30, 7(1). – P. 36.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ИЗМЕРЕНИЮ НАНОАЭРОЗОЛЯ В ВОЗДУХЕ

Слышкина Т. В., Гурвич В. Б., Рослый О. Ф., Мартин С. В., Галашева О. Е.

*ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья
рабочих промышленных предприятий» Роспотребнадзора,
Екатеринбург, Россия
E-mail: slishkina@ymrc.ru*

Проблема количественного измерения наноаэрозоля с частицами до 100 нм в производственном и атмосферном воздухе чрезвычайно актуальна, поскольку он присутствует в воздухе вместе с ультрамикро-, микро-, макрочастицами. Российскими и зарубежными исследователями предлагаются разные пути решения задачи отбора наноаэрозоля для дальнейшего исследования.

В результате теоретической проработки вопроса и лабораторных исследований нами был выбран наиболее оптимальный и рациональный путь решения задачи отделения наноаэрозоля от общей массы аэрозоля на этапе пробоподготовки к количественному измерению химического состава этого аэрозоля — неорганических и органических соединений. Методика предполагает отбор аэрозоля с концентрированием в жидкую среду с получением стабилизированной суспензии, измерением фракций дисперсных частиц с помощью прибора Sald 2300 фирмы Shimadzu, отделением фракций с размерами частиц более 100 нм путем вакуумного фильтрования через специальные трековые мембранные неволокнистые фильтры и дальнейшее исследование фильтрата: количественное измерение химического состава фракции содержащей наночастицы до 100 нм – неорганических и органических соединений. Разработан алгоритм проведения количественных измерений наноаэрозоля в воздухе: отбор, подготовка образца (пробы), количественное измерение 17 металлов (Al, Fe, Ca, Cd, Co, Si, Mg, Mn, Cu, Mo, Ni, Sn, Pb, Ti, Cr, Zn, Zr) атомно-абсорбционным методом с электротермической атомизацией, полициклических ароматических углеводородов – высокоэффективной жидкостной хроматографией. Методика апробирована на ряде промышленных предприятий Уральского региона на участках проведения пирометаллургических процессов: плавка, розлив металла.

**О СООТНОШЕНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ
ЛЁГОЧНУЮ ТОКСИКОКИНЕТИКУ МЕТАЛЛОСодЕРЖАЩИХ
НАНОЧАСТИЦ, ОТЛАГАЮЩИХСЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ
ИНГАЛЯЦИОННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ (НА ПРИМЕРЕ Fe₂O₃)**

**Сутункова М. П.¹, Привалова Л. И.¹, Кацнельсон Б. А.¹, Гурвич В. Б.¹,
Минигалиева И. А.¹, Соловьёва С. Н.¹, Шишкина Е. В.², Зубарев И. В.²**

¹ *ФБУН Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны рабочих
промпредприятий Роспотребнадзора,*

Россия, Екатеринбург

² *Уральский центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии» УрФУ*

Россия, Екатеринбург

E-mail: marinasutunkova@yandex.ru

Витающие наночастицы (НЧ) оксида железа Fe₂O₃ со средним диаметром 14±4 нч, образующиеся при искровой абляции электродов из железа 99,99 % чистоты, подавались в затравочную установку типа «только нос» для крыс по 4 часа в день, 5 раз в неделю на протяжении 3, 6 или 10 мес. при средней концентрации 1,14±0.01 мг/м³. Наночастицы, отобранные из воздуха, оказались нерастворимыми в деионизированной воде, но постепенно растворялись в бесклеточном супернатанте жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже, и в стерильной бычьей сыворотке крови.

Содержание Fe₂O₃ в лёгких было измерено с помощью ЭПР-спектроскопии, а факт задержки НЧ в лёгких и головном мозгу визуализирован при просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Найдено относительно низкое, но значимое накопление Fe₂O₃ в лёгких, постепенно нарастающее во времени, но с тенденцией к достижению равновесного уровня. При ПЭМ обнаружена задержка НЧ в альвеолоцитах и в миелиновой оболочке внутримозговых нервных волокон, связанная с их ультраструктурным повреждением.

Разработана и идентифицирована многокамерная математическая модель, описывающая токсикокинетику ингалированных НЧ после отложения в глубоких дыхательных путях как процесс, контролируемый (а) их высокой способностью пенетрировать через альвеолярную мембрану; (б) активным эндоцитозом; (в) растворением «ин виво». В данном исследовании именно механизмы, зависящие от растворения, оказались доминирующими из-за относительно высокой растворимости мельчайших Fe₂O₃-НЧ «ин виво».

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ЭКСПОЗИЦИЙ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Фатхутдинова Л. М.

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ,

Казань, Россия

E-mail: liliya.fatkhutdinova@gmail.com

Количество предприятий, на которых производятся или применяются углеродные нанотрубки (УНТ) и другие типы углеродных наноматериалов, растет из года в год. При этом гигиенических исследований, посвященных оценке производственных экспозиций, относительно немного.

Задача количественной оценки содержания УНТ в воздухе может быть решена различными способами. Определение массовой концентрации УНТ по содержанию сопутствующих металлов-катализаторов [1] является непрямым методом. Однако концентрации металлов-катализаторов, встроенных в УНТ, могут оказаться очень незначительными для количественного определения; кроме того, на содержание металлов могут существенно повлиять внешние загрязнения [2].

Также необходимо отметить тот факт, что количественные зависимости между содержанием металлов и массой УНТ могут быть очень переменными. Напрямую определять содержание элементного углерода, из которого состоят УНТ, в образце, отобранном из воздуха рабочей зоны, позволяет термооптический анализ [2]. Для дополнительной характеристики производственных экспозиций применялись также просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и некоторые другие методы (например, прямая инструментальная оценка наночастиц) [3]. Кроме того, российскими исследователями был предложен прямой подсчет отдельных нанотрубок, отобранных в жидкую среду (дистиллированную воду) [4].

Характеристика фактических экспозиций имеет большое значение для планирования токсикологических экспериментов, в том числе предназначенных для обоснования предельно допустимых уровней воздействия. Сотрудниками Казанского медицинского университета в сотрудничестве с исследовательской группой из Национального института охраны и медицины труда (НИОМТ – NIOSH) США были изучены уровни МУНТ в воздухе рабочих мест российского предприятия-производителя.

Исследование проводили на предприятии, использующем для синтеза МУНТ реактор каталитического пиролиза углеводородов. Отбор проб воздуха проводили в зоне дыхания работника синхронно на фильтры из смешанных эфиров целлюлозы (СЭЦ-фильтры) диаметром 37 мм с диаметром пор 0.8 мкм

(для ПЭМ) и высокочистые кварцевые фильтры диаметром 25 мм (для термооптического анализа).

Концентрации респираторной фракции аэрозоля в зоне дыхания работника, усредненные за 8-часовой период, находились в диапазоне от 0,54 до 6,11 мкг/м³ (в пересчете на элементный углерод) и часто превышали рекомендованный НИОМТ – NIOSH уровень в 1 мкг/м³. Кроме того, частицы МУНТ обнаруживались в воздухе рабочих помещений даже в нерабочее время, при выключенном оборудовании. В воздухе МУНТ присутствовали в виде агломератов размерами от 1 до 10 мкм.

Наибольшие значения содержания элементного углерода в воздухе рабочей зоны, как и предполагалось, были выявлены в ходе процесса ручного сбора продукта из реактора, в то время как лабораторная работа сопровождалась наименьшими массовыми значениями содержания аэрозоля МУНТ. Полученные данные согласуются с измерениями, выполненными на разных предприятиях двумя другими международными группами (из США [5] и Швеции [6]) с применением аналогичных методологических подходов (ПЭМ-метод в сочетании с термооптическим анализом).

Также было установлено, что рекомендованный МР 1.2.2639-10 подсчет количества индивидуальных МУНТ, отобранных из воздуха на дистиллированную воду [4], трудно применим, так как последние присутствуют в воздухе в виде агломератов размером 0,5–10 мкм. Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости пересмотра отечественных подходов к методам оценки экспозиций и нормированию УНТ в объектах окружающей среды.

В исследованиях на мышах нами был обнаружен профибротический потенциал нативных промышленных МУНТ, причем гистологическая картина фиброза сопровождалась достоверным дозо- и времязависимым повышением уровней таких биологических маркеров, как TGF- β и остеокальцин в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже [7]. В ходе эпидемиологического биомаркерного исследования с участием экспонированных к МУНТ работников (10 человек) и контрольной группы (12 человек) было установлено, что контакт с аэрозолем МУНТ на рабочих местах может приводить к изменению содержания некоторых маркеров фиброгенных изменений в сыворотке крови и образцах индуцированной мокроты. В частности, уровни TGF- β 1 в сыворотке крови и KL-6 в образцах мокроты оказались достоверно зависимыми от экспозиции к МУНТ [8].

Кроме того, анализ профиля экспрессии мРНК выявил значимое повышение экспрессии генов, кодирующих KL-6, и ряда других генов, регулирующих его активность (IL6, EGFR, TGF β , ERK, PDGFA, CASP8).

Сравнение профилей экспрессии неcodирующих и матричных РНК в группе работников, подвергавшихся воздействию МУНТ, и контрольной группе выявило достоверные различия, свидетельствующие о том, что профессиональные экспозиции к МУНТ могут потенциально повышать риски развития легочных и сердечно-сосудистых заболеваний, а также злокачественных новообразований, согласуясь с данными, полученными ранее исследователями в экспериментах *in vivo*.

В отсутствие убедительных данных о безопасности МУНТ для здоровья человека и исходя из принципа разумной предосторожности, на производствах необходимо внедрять систему профилактических мероприятий. Экспозиции могут быть уменьшены за счёт проектирования закрытых технологических процессов, контроля уровней МУНТ в различных технологических зонах и в зоне дыхания работников, санитарно-технических мероприятий, применения средств индивидуальной защиты. Биологический мониторинг и медицинские осмотры работников позволят выявить ранние признаки нарушений здоровья и накопить банк биологических образцов для последующих исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baron P.A. Evaluation of aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotubes material / P.A. Baron, A.D. Maynard, M. Foley // NIOSH Report. NIOSH DART – 02 – 191. – 2002.
2. Birch M.E. Occupational monitoring of particulate diesel exhaust by NIOSH method 5040 / M.E. Birch // Appl. Occup. Environ. Hyg. – 2002. – Vol.17. – P. 400-405.
3. Carbon nanotube and nanofiber exposure assessments: an analysis of 14 site visits /M.M. Dahm, M.K. Schubauer-Berigan, D.E. Evans, M.E. Birch at el. // Ann. Occup. Hyg. – 2015. – Vol. 59, №9. – P.1135-1151.
4. Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии: МР 1.2.2639-10. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 79 с.
5. Occupational exposure assessment in carbon nanotube and nanofiber primary and secondary manufacturers: mobile direct-reading sampling / M.M. Dahm, D.E. Evans, M.K. Schubauer-Berigan, M.E. Birch at el. // Ann. OccupHyg. – 2013. – Vol. 57. №3. – P. 328-344.
6. Exposure and emission measurements during production, purification, and functionalization of arc-discharge-produced multi-walled carbon nanotubes / M. Hedmer, C. Isaxon, P.T. Nilsson, L. Ludvigsson at el. // Ann. Occup. Hyg. – 2014. – Vol.58, № 3. – P. 355-379.
7. Evaluation of fibrogenic potential of industrial multi-walled carbon nanotubes in acute aspiration experiment / T.O. Khaliullin, R.R. Zalyalov, L.M. Fatkhutdinova, A.A. Shvedova at el. //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol.158, № 5. – P. 684-687.
8. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs / L.M. Fatkhutdinova, T.O. Khaliullin, O.L. Vasil'yeva, R.R. Zalyalov at el. // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2016. – Vol. 299, № 5. – P. 125-131.
9. Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes / A.A. Shvedova, N. Yanamala, E.R. Kisin, T.O. Khailullin at el. // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11, № 3. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150628>

МОДЕЛИ IN VITRO ДЛЯ ОЦЕНКИ КРАТКОВРЕМЕННОГО И ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ

Фрелих Э.

*Медицинский исследовательский центр, Медицинский университет,
Грац, Австрия
E-mail: eleonore.froehlich@medunigraz.at*

Постановка проблемы. Наночастицы входят в состав большого количества продукции промышленного, пищевого, косметического и медицинского назначения. Поэтому население в целом подвергается воздействию наночастиц различными путями, наиболее важными из которых являются перкутанный, пероральный и ингаляционный. По-прежнему до конца не ясно, какой потенциальный риск для здоровья связан с этими путями воздействия. Нанотехнология – одна из передовых технологий 21 века, и количество искусственных наноразмерных материалов постоянно растёт. Поскольку по этическим и экономическим соображениям испытание многих частиц невозможно, укрепилась позиция испытаний в системах с физиологически адекватным воздействием *in vitro*. Оценка безопасности наночастиц осложнена из-за неопределённости, связанной с реальными уровнями воздействия. К другим осложняющим факторам относятся изменения свойств частиц (в частности, дисперсность и свойства поверхности) в биологических матрицах и помехи, которые создают наночастицы в системах обнаружения. Цитотоксичность наночастиц подробно изучалась с использованием традиционного скрининга на цитотоксичность.

Такой скрининг подразумевает использование веществ в высоких концентрациях, а измерение жизнеспособности клеток обычно проводится через 24 часа после воздействия. Поскольку происходит зависящая от концентрации агломерация наночастиц, эффекты воздействия высоких доз в такие короткие сроки, возможно, окажутся лишёнными прогностической ценности для определения эффектов длительного воздействия низких доз на клетки, что, по-видимому, больше подходит для более приближенного к реальности описания воздействия наночастиц на человека.

Для того чтобы получить более полное представление о нанотоксичности, мы изучили поглощение и зависимость от размера и заряда частиц цитотоксичность, а также характер токсического действия наночастиц полистирола на панели клеточных линий. Сравнивались эффекты воздействия частиц полистирола, наночастиц двуокиси кремния и коротких углеродных нанотрубок на длительную (многokrатно в течение 4 недель) и кратковременную (однократно в течение 24 часов) клеточные культуры.

Результаты. Использование дополнительных контрольных мер и нескольких скрининговых тестов помогло избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов при скрининге на цитотоксичность. Когда

происходили помехи, для некоторых частиц в скрининговый тест можно было внести изменения. Наночастицы вызывали разную реакцию в зависимости от типов клеток и системы экспозиции. При воздействии частиц полистирола клетки, выращиваемые в суспензии, клетки с высокой скоростью пролиферации и клетки малого размера оказались более восприимчивы к цитотоксическим повреждениям, чем прикрепившиеся, медленно пролиферирующие и более крупные клетки. При воздействии аэрозолей токсическое действие на респираторные клетки оказалось более сильным по сравнению с воздействием наночастиц, вводимых в растворе. Можно установить зависимость между механизмом гибели клеток (апоптозом в сопоставлении с некрозом) и размером, а также параметрами поверхности частиц, однако связь между цитотоксичностью наночастиц и индуцированием окислительного стресса прослеживается довольно слабая. Необходимо было, чтобы предназначенные для исследований длительного воздействия системы экспозиции были различными для клеток разных типов, а для прикрепившихся эндотелиальных и респираторных клеток были построены разные модели. При воздействии частиц полистирола наблюдалась выраженная цитотоксичность, однако эффекты коротких углеродных нанотрубок выражены относительно слабо.

Заключение. Цитотоксичность наночастиц может определяться, даже в случае помех, с помощью окрашивания, флуоресценции, светового рассеяния и так далее при условии, что будут применены соответствующие контрольные меры, а тесты будут адаптированы. Системы с физиологически адекватным воздействием дают результаты, отличные от результатов традиционного скрининга на цитотоксичность. Как ожидалось, цитотоксичность наночастиц при многократном воздействии оказалась выше, чем при кратковременном воздействии. Углеродные нанотрубки с большой относительной длиной (отношением длины к диаметру) проявили большую цитотоксичность, чем нанотрубки с малой относительной длиной, но в целом наблюдаемые в клетке эффекты при концентрациях, приближенных к реальности, были слабые.

УДК 615.9

ОЦЕНКА РИСКОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ В РЕАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Цацакис А. М.

*Кафедра токсикологии и судебной медицины, Медицинский факультет,
Университет Крита, Ираклион, Греция
E-mail: tsatsaka@uoc.gr*

Все слои населения подвергаются неконтролируемому многокомпонентному воздействию из многочисленных источников в дозах, примерно равных установленным нормативам или заметно ниже этих пределов. Следовательно, традиционная токсикологическая оценка хронического

однокомпонентного воздействия может оказаться неподходящей для точного определения всех рисков. Поэтому с целью дать ответы на многие вопросы нами предлагается экспериментальная методика: долгосрочное токсикологическое исследование с использованием смеси ежедневно применяемых в быту химических веществ (пестицидов, пищевых добавок, а также других веществ, входящих в состав продукции, характерной для современного образа жизни) в соответствующих реальным условиям низких дозах, вписывающихся в установленные нормативы. При этом одновременно исследуются несколько ключевых конечных показателей, таких как генотоксичность, гормональные нарушения, токсичность для органа-мишени, включая сердце, а также системные пути и механизмы действия, например, окислительный стресс. В реальных условиях при употреблении пищи и воды, а также при контакте с потребительской продукцией человек подвергается воздействию сложной смеси веществ. Однако при оценке риска вещества обычно исследуются по отдельности. Отсюда следует, что нынешний нормативный подход не позволяет выполнить общую оценку риска с высокой степенью достоверности. В ходе исследования будет определена кумулятивная токсичность смесей, состоящих из пестицидов разных классов, и смесей, включающих пестициды разных классов, а также пищевые добавки и химические вещества, входящие в состав потребительской продукции, в более приближенных к реальности дозах при длительном воздействии. Если гипотеза о том, что кумулятивное многокомпонентное воздействие повышает риск или даже говорит о ранее неизвестном опасном факторе, окажется верной, власти и научное сообщество получат подробную информацию, которая будет способствовать замене нынешней парадигмы однокомпонентной оценки риска более обоснованной парадигмой кумулятивной оценки риска.

УДК 613.6:615.9

ПРИМЕНЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ВРЕДНОГО ВЛИЯНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ АЭРОЗОЛЕЙ НА ОРГАНИЗМ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА НАРУШЕНИЙ ЗДОРОВЬЯ У РАБОТНИКОВ ГОРНОДОБЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

Чащин В. П.¹, Горбанев С. А.¹, Эллинген Д.², Томассен Ю.²

¹*ФБУН «Северо-западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Роспотребнадзора,
Санкт-Петербург, Россия*

²*Национальный институт профессионального здоровья,
Осло, Норвегия*

E-mail: valerych05@mail.ru

Оценка влияния ультратонких фракций дизельных аэрозолей на риск нарушений здоровья выполнена в форме поперечного эпидемиологического исследования у 195 здоровых работников открытых и подземных рудников в Евроарктическом Баренц-регионе. Работники были распределены на 5

экспозиционных групп, отличающихся содержанием в воздухе аэрозолей при умеренно холодных (от +5,0 до +16,2⁰С) и низких (от -3,5 до -13,5⁰С) температурах воздуха. Проведено изучение основных ингредиентов дизельных загрязнений, включая содержание в воздухе органических и неорганических соединений углерода, окислов азота, а также массы, химического состава, размеров, количества и распределения аэрозолей в воздухе в зоне дыхания.

Оценка экспозиции проводилась по результатам измерений средневзвешенных концентраций вредных веществ в течение 2-х смежных рабочих смен (не менее 6 часов в смену) при выполнении трудовых операций в рудниках с массовым применением горных машин, оснащенных дизельными двигателями. Одновременно определялись метеорологические факторы, тяжесть труда, а также самооценка теплоощущений. Кроме того, перед началом исследования и дважды после его завершения (через 24 и 48 часов) проводилось определение в крови у каждого работника трех групп биомаркеров вредных эффектов, характеризующих респираторный риск (протеины СС 16 и сурфактанта D), кардиоваскулярный риск и системное воспаление (TNF- α , IL-6, Micro-CRP), риск тромботических нарушений (D-dimer, P-selectin). Для учета и коррекции «мешающего» действия табачного дыма, в т. ч. его пассивной ингаляции, проводилось определение котинина в моче в качестве биомаркера никотиновой нагрузки.

Результаты исследований показали, что среднесменное содержание массы аэрозолей, представленных преимущественно наноразмерными фракциями, в воздухе открытых и подземных рудников в холодный период года оказалось в диапазоне 0,3-1,4 мг/м³, что заметно ниже предельно-допустимых концентраций для слабо и умеренно фиброгенной пыли (4-10 мг/м³). Содержание монооксида углерода и оксидов азота в периоды исследований также оказалось существенно ниже их ПДК. Вместе с тем, установлено, что количественная концентрация взвешенных частиц в твердой фазе находилась в диапазоне 10⁸-10¹⁰ частиц/м³. Их ожидаемая ингаляционная доза для работников составила примерно 10¹²-10¹⁴ частиц в общем объеме вдыхаемого воздуха за рабочую смену. Наибольшие концентрации взвешенных частиц обнаружены в зоне дыхания у машинистов горных машин, оснащенных дизельными двигателями, в подземных рудниках.

Статистический анализ результатов, полученных в разных экспозиционных группах, показал, что ингаляционное воздействие дизельных аэрозольных загрязнений даже в концентрациях ниже ПДК, установленных для воздуха рабочей зоны, существенно увеличивает уровни биомаркеров кардиоваскулярного и респираторного рисков, таких как Интерлейкин-6, TNF- α , С-реактивный белок и белок клеток Клары (СС16). При этом выявлена тесная связь между содержанием TNF- α , IL-6 в крови у работников и их расчетной ингаляционной дозой, выраженной в количестве частиц в объеме вдыхаемого воздуха за смену.

У работников, подвергавшихся воздействию дизельных загрязнений при низких температурах воздуха, риски кардиоваскулярных (TNF- α , IL-6, Micro-CRP) и тромботических нарушений (D-dimer) оказались существенно выше в

сравнении с работниками, подвергавшихся воздействию аналогичных концентраций этих загрязнений в более благоприятных микроклиматических условиях. Установлена также статистически существенная связь между интенсивностью табакокурения (по экскреции котинина) и уровнями биомаркеров респираторного и кардиоваскулярного риска.

Таким образом, наряду с действующими в настоящее время критериями оценки вредного воздействия аэрозолей (на основе ПДК м.р. и с.с. для воздуха рабочей зоны), в случаях преобладания их наноразмерных фракций, целесообразно рассмотреть применение дополнительных критериев, учитывающих количество или суммарную поверхность ингалируемых частиц. При проведении эпидемиологических исследований по оценке влияния ультратонких фракций углеродсодержащих аэрозолей необходим учёт и статистическая коррекция результатов по показателю интенсивности табакокурения.

УДК 613.62: 615.017: 616.079

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИО-, ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И КАНЦЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ SiO₂ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

Шабашева Л. В., Протасова Г. А., Панферова Ю. А., Попов В. Б.

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: shabash69@gmail.com

Разработан комплекс экспресс-методов оценки цито-, гено-, эмбриотоксической и канцерогенной активности наночастиц (НЧ), включающий одновременное использование трех моделей: культур до- и постимплантационных зародышей мышей (стадии дробления – формирования бластоцисты, 1-5 дни развития), и крыс (формирование головного отростка – 30 пар сомитов, 9,5-11,5 дни развития), а также культуры лимфоцитов периферической крови человека. Основной целью явилась оценка цито-, гено-, эмбриотоксических и канцерогенных свойств наночастиц SiO₂ в экспериментах in vitro.

В экспериментах использовали наночастицы SiO₂ размером-12 нм (Sigma-Aldrich). Для предотвращения агломерации предварительно суспензию обрабатывали ультразвуком, в дальнейшем в водную суспензию НЧ добавляли БСА в конечной концентрации 15,0 мкг/мл. НЧ вносили в культуральную среду в концентрациях 20, 100 и 200 мкг/мл. Для оценки эмбриотоксического потенциала НЧ дробящиеся зародыши мыши со стадии 2-х бластомеров культивировали в каплях среды под слоем парафинового масла (по 20 эмбрионов на каплю) с добавлением различных концентраций НЧ.

Культивирование проводили в мультигазовом инкубаторе ($O_2/N_2/CO_2$) в течение 72 ч. Постимплантационные эмбрионы крысы культивировали в течение 48 ч в инкубаторе CO_2 со стадии 2-4 пар сомитов до стадии 30 сомитов при добавлении в культуральную среду суспензий НЧ SiO_2 в концентрациях 20-200 мкг/мл [1]. Оценку экспрессии генов, связанных с формированием у эмбрионов нервной трубки и ее дефектов, проводили методом количественной ПЦР с использованием наборов праймеров RT2-qPCR Assay SYBR Green I (Sabioscience, Qiagen) с нормированием по гену 18S рРНК. В качестве маркеров были выбраны гены, связанные с формированием нервной трубки у эмбрионов крысы начальных стадий органогенеза: *bmp2* и *bmp4* (bone morphogenetic proteins 2 and 4, костный морфогенетический фактор 2 и 4), *ssh* (sonic hedgehog), *tulp3* (tubby-like protein 3, ингибитор *ssh*, регулятор сигналинга), *neurog1* (neurogenin-1, нейрогенин-1). Нарушения экспрессии этих генов приводят к появлению морфогенетических дефектов краниофациального отдела. Цито- и генотоксические эффекты НЧ оценивали в культуре лимфоцитов периферической крови человека (72 ч) в условиях цитокинетического блока (внесение цитохалазина В) [2]. В работе представлена также апробация альтернативной модели оценки канцерогенеза с использованием культуры лимфоцитов периферической крови человека. В основе подхода лежит выявление возможной малигнизации клеток на препаратах интерфазных ядер лимфоцитов с помощью FISH со специфичным к локусу 20q13 (ген AURKA) зондом после воздействия известным канцерогеном $NiCl_2$ (положительный контроль, 50 мкг/мл) и НЧ SiO_2 (200 мкг/мл). Ген AURKA кодирует Aurora-киназу, необходимую для правильной сегрегации хромосом в митозе. Показано, что амплификация данного гена и/или его сверхэкспрессия наблюдается в клетках многих злокачественных опухолей (колоректальном раке, раке мочевого пузыря, мозговых опухолях, раке груди, яичников, и т. д.). Используя FISH с зондом, специфичным к локусу 20q13 (ген AURKA), анализировали: 1) количество копий гена AURKA; 2) синхронность репликации гомологичных локусов (нарушается при генетическом дисбалансе, в том числе в раковых клетках); 3) апоптоз [3, 4, 5].

Статистическую обработку материала проводили на основе множественных сравнений средних значений, используя тест Бартлета, предварительно оценивали однородность дисперсий в изучаемых выборках. При подтверждении однородности использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей коррекцией уровней различий между контролем и подопытными группами по t-тесту Бонферрони или q-тесту Даннета; при отсутствии однородности дисперсий для сравнения средних величин в группах применяли непараметрический критерий Крускала-Уоллиса с коррекцией по тесту Данна [6].

Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные обрабатывали в статистической компьютерной программе Prizm 5 (GraphPad, США).

Прямое внесение наночастиц SiO_2 в концентрациях 100 и 200 мкг/мл в культуру доимплантационных эмбрионов индуцировала единичную гибель эмбрионов, вызывая торможение темпов дробления, которое приводило к достоверному уменьшению общей клеточной массы ($P < 0,01$, $P < 0,001$) и количества бластоцист, находящихся в процессе хетчинга (уменьшение в 1,4 – 1,3 раза по отношению к контролю, $P \geq 0,05$). НЧ диоксида кремния в концентрации 20 мкг/мл не оказывали влияния на развитие доимплантационных эмбрионов. При культивировании эмбрионов на начальных этапах органогенеза в среде, содержащей НЧ SiO_2 в тех же концентрациях, эмбриолетальный эффект не был отмечен, но концентрации 100 и 200 мкг/мл вызывала ряд структурных и динамических патологических изменений.

Отмечено также общее торможение морфогенеза эмбрионов (замедление сомитогенеза, уменьшение кранио-каудального размера). Оценка экспрессии генов показала, что при добавлении в культуральную среду наночастиц диоксида кремния в концентрациях 100 и 200 мкг/мл происходила активация экспрессии нейрогенина-1 на уровне транскрипции (в 6,77 и 5,1 раз, соответственно); уровни экспрессии прочих генов, ассоциированных с нейрональной дифференцировкой и формированием нервной трубки, значительно не изменялась. Активация нейрогенина возможно связана с нарушениями развития нервной трубки, однако это требует дополнительных исследований.

НЧ SiO_2 в концентрациях 100 и 200 мкг/мл не индуцировали цито- и генотоксические эффекты в культуре лимфоцитов периферической крови человека (пролиферативная активность клеток, частота пикнозов, апоптозов, количество микроядер не отличалась от контроля).

При оценке возможной канцерогенности НЧ SiO_2 наблюдалось увеличение численности клеток с повышенным количеством копий AURKA, увеличение повреждённых и апоптотических клеток и десинхронизация репликации AURKA. Также при воздействии НЧ SiO_2 отмечено повышенное количество клеток с одним FISH-сигналом AURKA по сравнению с нормой и положительным контролем.

Результаты, полученные при воздействии 200 мкг/мл SiO_2 и 50 мкг/мл NiCl_2 , статистически не различались за исключением повышенного числа ядер с одиночным FISH-сигналом в экспериментах с НЧ. Полученные данные подтверждают многочисленные сведения о канцерогенности NiCl_2 . Результаты оценки наночастиц SiO_2 также указывают на их вероятную канцерогенность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Popov V. In vitro embryotoxicity testing / V. Popov, G. Protasova // Reproductive and Developmental Toxicology. – 2011. – P. 147-157.
2. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay / M. Fenech // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2, №5. – P. 1084-1104.
3. Yang F., Guo X., Yang G. AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma / F. Yang, X. Guo, G. Yang // Modern Pathology. – 2011. – Vol. 24. – P. 836-845.
4. Asynchronous replication of homologous DNA alpha-satellite loci in man is associated with nondisjunction / T. Litmanovitch, M.M. Altaras, A. Dotan, L. Avivi // Cytogenetics and cell genetics. – 1998. – Vol. 81. – P. 26-35.
5. Mendoza A. Silica nanoparticles induce oxidative stress and inflammation of human peripheral blood mononuclear cells / A. Mendoza, J.A. Torres-Hemendez, G.G. Ault // Cell Stress Shaperones. – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 777-790.
6. Glantz S.A. Primer of Biostatistics / S.A. Glantz. – NY-Toronto, 1992. – 440 p.

УДК 613.2: 615.015.3: 615.9

ПРОТЕОМНЫЕ И МЕТАБОЛОМНЫЕ МАРКЕРЫ НАНОТОКСИЧНОСТИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

Шипелин В. А., Гмошинский И. В., Шумакова А. А., Хотимченко С. А.

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,

Москва, Россия

E-mail: v.shipelin@yandex.ru

В последнее время, наряду с исследованием отдельных биомаркеров, отражающих развитие иммунной и воспалительной реакции под действием наночастиц (НЧ), для оценки их токсического действия начинают продуктивно использоваться так называемые «омик» технологии, в первую очередь это протеомика и метаболомика. Эти современные экспериментальные подходы позволяют изучать процессы метаболизма, происходящие в клетках, и сочетают возможности одновременного выявления и количественного определения в биологическом образце сотен и тысяч видов макромолекул (белков) и биоинформатического анализа значимости их множественных изменений (т.н. «большие данные», «big data») для изучаемого патологического процесса.

Важная роль протеомных и метаболомных маркеров токсичности была установлена в ряде работ, посвященных токсиколого-гигиенической оценке углеродных нанотрубок (УНТ). Токсичность УНТ является важной проблемой нанотоксикологии. В работах 2000-х годов в качестве биомаркеров токсического действия УНТ рассматривались, преимущественно, продукты

перекисного окисления липидов и ферментативные маркеры повреждения клеток различных типов. Впоследствии было показано, что в основе токсического действия УНТ на организм лежат иммунопатологические механизмы, а, следовательно, ранними и высокочувствительными маркерами такого действия могут быть экспрессия и уровни различных провоспалительных цитокинов и хемокинов. Одной из первых работ на это тему является исследование, в котором было установлено, что инкубация эпидермальных кератиноцитов с многослойными УНТ (МУНТ) сопровождалась выработкой клетками провоспалительного IL-8 [1]. По данным однослойные УНТ при интратрахеальной инстилляцией или ингаляции у крыс вызывали экспрессию мРНК различных провоспалительных цитокинов, будучи при этом более активными, чем НЧ сажи, золота, квантовые точки и фуллерены [2].

При наблюдениях в условиях реального предприятия, выпускающего МУНТ, было показано, что в мокроте работников производства, контактирующих с аэрозолями этого наноматериала, повышаются уровни таких маркеров воспаления и фиброза, как IL-1 β , IL-6, TNF- α , а также KL-6 [3,4]. Наиболее чувствительным маркером экспозиции к МУНТ в сыворотке крови был хемокин TGF- β . К аналогичным результатам привело исследование биомаркеров ингаляционной токсичности в эксперименте на мышах C57Bl/6. По мнению авторов, полученные данные указывают на актуальность мониторинга экспозиции МУНТ на рабочем месте с использованием указанных биомаркеров, как свидетелей этого процесса. В другом исследовании охарактеризована роль в токсичности МУНТ группы биомаркеров, связанных с механизмом развития воспалительной реакции, опосредуемой воспалительным каскадом NLRP3 инфламмосом [5]. При интратрахеальной инстилляцией мышам C57Bl/6 нативных либо карбоксилированных МУНТ отмечено повышение уровней IL-1 β , IL-18, IL-33, а также активности катепсина В, лактатдегидрогеназы и общего содержания альбумина в бронхоальвеолярном лаваже. Выявлена тесная взаимосвязь между токсичностью различных форм МУНТ и активацией NLRP3 в легочной ткани. Очевидно, что правильному выбору метаболомных биомаркеров должен предшествовать анализ большого количества данных. Но такой выбор позволит выбрать правильный вектор для дальнейших исследований в нанотоксикологии. На текущий момент нами проведен 100-дневный подострый эксперимент с пероральным введением МУНТ, в котором исследован широкий спектр метаболомных показателей. Результаты этой работы будут опубликованы в следующем году.

Возможности использования протеомных биомаркеров мы рассмотрим на примере наших работ по протеомному профилированию микросомальной фракции печени с использованием метода 2D-электрофореза с tandemной масс-

спектрометрией. В рамках 92-дневного эксперимента по токсиколого-гигиенической оценке препарата наноразмерного коллоидного серебра «Арговит®» в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг массы тела методом 2D-электрофореза было проанализировано 30 образцов микросом печени крыс пяти групп, по 6 гелей в каждой группе. Как показали проведенные исследования, НЧ серебра оказывают значимое влияние на протеом микросомальной фракции печени крыс, что проявляется не только в исчезновении, но и в появлении ряда белковых пятен. Большинство выявленных переменных белков являются низкокопийными с очень малыми величинами оптической плотности пятен, что делает их идентификацию методом масс-спектрометрии проблематичной. В результате выполненного анализа был отобран ряд высококопийных белков микросомальной фракции, являющихся потенциальными кандидатами в биологические маркеры действия НЧ серебра. Их значимость в качестве маркеров нанотоксичности будет установлена после идентификации и установления функции соответствующих белков методом тандемной масс-спектрометрии.

Аналогично, в эксперименте с 28-дневным пероральным введением НЧ диоксида кремния в концентрациях 1, 10, 100 мг/кг массы тела, масс-спектрометрическая идентификация белков, экспрессируемых под действием НЧ в микросомах гепатоцитов, позволила выявить ряд белков, присутствующих в базе данных. Однако, биологическую функцию удалось установить только для одного доминантного белкового пика, исчезающего в микросомах печени под воздействием наибольшей из доз НЧ. Полученный пептидный спектр соответствовал белку с молекулярной массой 78 кДа – GRP78 (glucose-regulated protein precursor), принадлежащему к семейству белков теплового шока 70 kDa, известному, как шаперон и локализирующемуся в эндоплазматическом ретикулуме на поверхности клеток, в том числе гепатоцитах. Идентификация белковых пиков была сделана и в эксперименте с НЧ окиси алюминия, где НЧ в дозах 1 и 100 мг/кг массы тела перорально вводили животным на протяжении 28 дней. Было установлено, что под воздействием НЧ окиси алюминия вне зависимости от использованных доз во всех группах животных на электрофореграммах появлялись 11 новых белковых пятен, и исчезало 15 белковых пятен по сравнению с животными контрольной группы. Масс-спектральный анализ позволил выявить среди белков, экспрессируемых под воздействием НЧ в микросомах печени животных, ряд форм полипептидов, присутствующих в международной базе данных. Один из идентифицированных доминантных пиков был представлен протеасомой α type-3 фермента протеасомного эндопептидазного комплекса, а другой –

фактором
4B (ATG4B).

аутофагии

В другой нашей работе, где крысам на протяжении 28 дней перорально вводили НЧ диоксида титана (анатазная форма) в концентрациях от 0,1 до 10,0 мг/кг массы тела/день, была выявлена экспрессия белков микросом печени крыс, особенно выраженная при высоких концентрациях. Масс-спектрометрическая идентификация белков позволила выявить доминантный пик, экспрессируемый под воздействием НЧ в микросомах печени при дозе 0,1 мг/кг массы тела и более, для которого было установлено, что он представлен изоформой Mu 2 фермента глутатион-S-трансферазы. Молекулярная масса этого белка составила 41,55 кД, изоэлектрическая точка pI = 8,0.

Можно резюмировать, что в последнее время возможности протеомных исследований в нанотоксикологии значительно возросли в связи с внедрением методов биоинформатики при интерпретации данных. Поэтому, использование метода 2D-электрофореза с тандемной масс-спектрометрией является важным и перспективным инструментом для целей нанотоксикологии. Причем, идентификация экспрессируемых функционально значимых белков должна быть обязательным компонентом исследования, что в будущем позволит понять механизмы повреждающего действия НЧ и установить потенциальные «мишени» воздействия НЧ при их поступлении в организм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monteiro-Riviere N.A. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin / N.A. Monteiro-Riviere, A.O. Inman // Carbon. – 2006. – № 44. – P. 1070-1078.

2. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE-/- mice / N.R. Jacobsen, P. Møller, K.A. Jensen, U. Vogel // Part. Fibre Toxicol. – 2009. – Vol. 6, № 2. – P. 1-17.

3. Биологические эффекты многослойных углеродных нанотрубок при легочной экспозиции *in vivo* / Т.О. Халиуллин, Е.Р. Кисин, Р.Р. Залялов, А.А. Шведова и др. // Токсикологический вестник. – 2013. – № 4. – С. 17-21.

4. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs / L.M. Fatkhutdinova, T.O. Khaliullin, O.L. Vasil'yeva, R.R. Zalyalov et al. // Toxicology and Applied Pharmacology – 2016. – Vol.15. – № 299. – P.125-131.

5. Effect of multi-walled carbon nanotube surface modification on bioactivity in the C57BL/6 mouse model / T.M. Sager, M.W. Wolfarth, M. Andrew, A. Hubbs et al. // Nanotoxicology. – 2014. – Vol.8(3). – P. 317-327.

**ВКЛАД УРАЛЬСКОГО ЦЕНТРА КОЛЛЕКТИВНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ
«СОВРЕМЕННЫЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ»
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИКОЛОГИИ
НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ**

**Шур В. Я.¹, Тюрнина А. Е.^{1,2}, Кузнецов Д. К.¹, Шишкина Е. В.¹,
Васильева Д. С.¹, Важенин В. А.¹, Потапов А. П.¹, Морозова М. В.¹,
Зубарев И. В.¹, Пряхина В. И.¹**

¹*Институт естественных наук и математики, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»,
Екатеринбург, Россия*

²*Уральский научно-исследовательский институт метрологии,
Екатеринбург, Россия*

E-mail: vladimir.shur@urfu.ru

Изучение токсичности наночастиц (нанотоксикология) требует производства стабильных коллоидных растворов с высокой концентрацией модельных чистых наночастиц заданного состава, размера и формы. Лазерная абляция в воде открывает уникальную возможность производства коллоидных растворов чистых металлов и оксидов металлов с желаемыми параметрами. Коллоиды наночастиц Au, Ag, CuO, NiO, PbO, ZnO, Fe₂O₃ и Mn₃O₄ с узкой функцией распределения размеров и концентрацией до 0.5 г/л с достаточно высокой стабильностью были изготовлены для исследования влияния наночастиц на биологические ткани и клетки.

Импульсный волоконный иттербиевый лазер с длиной волны 1064 нм, длительностью импульса 100 нс и частотой повторения 21 кГц использовался для абляции чистой металлической мишени в деионизованной воде и последующей фрагментации суспензии. Синтез наночастиц проводился в несколько стадий: обработка поверхности с помощью сканирования фокусированным лазерным пучком, абляция мишени, дополнительная фрагментация, сушка для увеличения концентрации раствора до 0.5 г/л и нагрев для самоорганизованного изменения размера и формы наночастиц. Оптимизированная технология позволила производить необходимые коллоидные растворы со стабильностью более месяца из сферических наночастиц размерами от 10 до 60 нм. Функция распределения размеров наночастиц измерялась с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS и путем статистического анализа изображений, полученных сканирующим электронным микроскопом Auriga CrossBeam. Состав определялся с помощью конфокального микроскопа комбинационного рассеяния Alpha 300 AR WiTec.

Общая концентрация металла в образцах печени, почек, селезенки и мозга крыс, подвергавшихся воздействию наночастиц, определялась методом атомно-эмиссионной спектроскопии с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6500 Duo.

Образцы гомогенизированной ткани после лиофильной сушки растворялись в кислоте с помощью микроволновой системы MARS 5. Содержание наночастиц парамагнитных металлов определялось методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с помощью спектрометра электронного парамагнитного резонанса EMX Plus Bruker.

Влияние наночастиц на альвеолярные макрофаги исследовалось *in vivo* с помощью атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии. Обнаружено, что фагоцитоз наночастиц приводит к изменению морфологии поверхности клеток на наноуровне. Размеры ямок на поверхности, выявленных с помощью атомно-силовой микроскопии в клетках крыс, подвергавшихся воздействию наночастиц, близки к размерам использованных наночастиц. Такие ямки отсутствуют на поверхности контрольных клеток. Положение наночастиц в образцах ткани крыс и вызванные ими деструкции были выявлены с помощью сканирующей просвечивающей электронной микроскопии.

УДК 578.08:53.086

НАНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ: НА ПРИМЕРЕ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Янь Б.

Шаньдунский университет,

Цзинань, Китай

E-mail: drbingyan@yahoo.com

Многослойные углеродные нанотрубки широко используются в различных отраслях промышленности, биомедицине и во многих видах потребительской продукции. Однако серьёзные опасения вызывает их потенциальная токсичность. Многослойные углеродные нанотрубки попадают в клетки организма человека, создают помехи на путях клеточной сигнализации, различных клеточных функций, и приводят к нарушениям функций в организмах животных [1–5].

Поскольку значительная часть атомов многослойных углеродных нанотрубок находится на поверхности, химические модификации их поверхности, могут привести к значительным изменениям их биологических свойств. Применяв подход нанокOMBинаТОрных библиотек, мы модифицировали

поверхность многослойных углеродных нанотрубок. Выяснилось, что новые многослойные углеродные нанотрубки обладают меньшей токсичностью или перепрограммируют механизмы передачи сигнала в клетке [6–7].

При анализе больших массивов данных биотестов с помощью химической информатики и вычислительной химии было определено количественное соотношение наноструктуры и биологической активности (QNAR), также были построены модели для прогнозирования биосовместимости многослойных углеродных нанотрубок.

Работа выполнена при поддержке Государственного фонда естественных наук Китая (гранты №21137002 и 91543204), Стратегическая программа приоритетных исследований Китайской академии наук (грант XDB14030401).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mu, Q.X., Broughton, D.L., Yan, B. Endosomal leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake. *Nano Letters* 2009, 9(12), 4370-4375.
2. Mu, Q.X., Du, G.Q., Chen, T.S., Zhang, B., Yan, B. Suppression of Human Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling by Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* 2009, 3, (5), 1139-1144.
3. Mu, Q.X., Jiang, G.B., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chemical Reviews*.2014; 114(15):7740-7781.
4. Zhang, Y., Bai, Y.H., Jia, J.B., Gao, N.N., Li, Y., Zhang, R.N., Jiang, G.B., Yan, B. Perturbation of Physiological Systems by Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 3762-3809.
5. Bai, Y.H., Zhang, Y., Zhang, J.P., Mu, Q.X., Zhang, W.D., Butch, E., Snyder, S., Yan, B. Repeated carbon nanotube administrations in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(9), 683-689.
6. Zhou, H., Mu, Q., Gao, N., Liu, A., Xing, Y., Gao, S., Zhang, Q., Qu, G., Chen, Y., Liu, G., Zhang, B., Yan, B. A Nano-Combinatorial Library Strategy for the Discovery of Nanotubes with Reduced Protein-Binding, Cytotoxicity, and Immune Response, *Nano Lett.* 2008, 8 (3), 859-865.
7. Wu, L., Zhang, Y., Zhang, C.K., Cui, X.H., Zhai, S.M., Liu, Y., Li, C.L., Zhu, H., Qu, G.B., Jiang, G.B., Yan, B. Tuning Cell Autophagy by Diversifying Carbon Nanotube's Surface Chemistry. *ACS Nano*.2014 Mar 25; 8(3):2087-99.

**Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare
(Rospotrebnadzor)**

**Federal Budgetary Research Institution “Ekaterinburg Medical Research Center for
Industrial Workers’ Prophylaxis and Health Protection”, Rospotrebnadzor
Sverdlovsk Regional Office of the Federal Service on Customer Rights Protection and Human
Well-being Surveillance (Rospotrebnadzor)**

**Federal Budgetary Healthcare Institution “Hygiene and Epidemiology Centre”
in Sverdlovsk Region
Ural Federal University**

**Autonomous Non-Commercial Organization “Ural Regional Center for Environmental
Epidemiology”**

**TOPICS OF CURRENT HYGIENIC
IMPORTANCE IN NANOTOXICOLOGY:
THEORETICAL PREMISES, HAZARDS
IDENTIFICATION AND WAYS OF THEIR
ATTENUATION**

**Proceedings of the All-Russian Research and Practice Conference
with International Participation**

20-21 October 2016, Ekaterinburg

Ekaterinburg
2016

FOREWORD

Holding the All-Russian Research and Practice Conference with International Participation **“Topics of current hygienic importance in nanotoxicology: theoretical premises, hazards identification and ways of their attenuation”** is driven by developing the scientific basis and new applications for nanotechnology resulting in scores of new artificial or so called engineered nanomaterials.

At the same time nanotechnology and nanomedicine research brought to our notice great yet underestimated hygienic significance of nanoscale particles as a component of aerosols polluting the air in industrial facilities and the atmosphere using long existing manufacturing processes

In the last 10-12 years, studying nanoparticle characteristics and specific bioactivity mechanisms (including toxicity) at an ever increasing pace in many countries have shaped a new branch of toxicology – nanotoxicology.

There have been some developments in this field by the research institutions in Russia (including Rospotrebnadzor research institutions) and abroad.

The information provided by the scientists from Russia and other countries and published in these proceedings shows the progress made in this field and sets the priorities for hygienic nanotoxicology.

The most interesting and relevant materials will be reported and discussed in the form of oral presentations at the conference

We hope that the information from the proceedings will be of interest and will prove useful to deal with hygienic and nanotoxicological challenges, to develop methodological approaches and establish occupational and non-occupational safe exposure levels and increase organism’s resistance to their adverse effects.

Editorial board

LOCAL AND SYSTEMIC EFFECTS INDUCED BY INHALED PARTICLES AND NANOPARTICLES

Alfaro-Moreno E.

Swedish Toxicology Sciences Research Center, Sweden

Instituto Nacional de Cancerología, México

E-mail: ealfaro.incan@gmail.com

Humans have been exposed to particles via inhalation since the dawn of time. During the 20th century, the epidemiological data showed that miners exposed to coal, asbestos and other minerals developed lung diseases such as lung fibrosis and cancer. Exposure to particles in urban areas was also identified as risk factor for lung and circulatory diseases. Due to this adverse outcomes related to inhaled particles, great efforts have been done to control the exposure in urban areas, indoor environments and at work places. In the last 30 years thousands of new particles with sizes under 100 nm have been produced and many of those particles have been not properly assessed from the toxicological point of view. Inhaled particles with sizes under 10 µm can reach the lower airways and those with sizes under 3 µm can reach the lung. Particles with sizes under 0.1 µm may translocate out of the lung and reach the circulatory system, and therefore reach distant organs. Among the adverse outcomes related to inhaled particles the most important are: local and systemic inflammation, lung fibrosis, lung cancer, decrease of the coagulation time, endothelial dysfunction, changes in the viscosity of the plasma, and recently it has been suggested that nanoparticles that reach the brain may be linked to Parkinson's disease and Alzheimer's disease.

HYGIENIC ISSUES ASSOCIATED WITH THE PRODUCTION AND APPLICATION OF ENGINEERED NANOMATERIALS

**Britanov N. G., Gorkina I. K., Klauchek V. V., Pocheptsov A. Y.,
Tochilkina. L. P., Filatov B. N.**

Federal state unitary enterprise «Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology» of the Federal Medical and Biological Agency

Volgograd, Russia

E-mail: filatov@rihtop.ru

Although some of Russia's industries lag behind the West, nanotechnologies are gradually finding their way into practice. The progressive value of such technologies is obvious and does not need any discussion. But it is also obvious that the production of nanomaterials and their industrial applications without supporting full-scale sanitary and hygienic studies can cause harm in occupational settings [1-4].

Undoubtedly, it is primarily essential to regulate admissible concentrations of nanoparticles in workroom air and ensure that occupational environments are not

polluted with nanoparticles, which requires the usage of corresponding industrial processes and exercise of due sanitary chemical control. However, this is exactly where medical and hygienic problems arise in relation to human health in connection with the introduction of nanotechnologies. Unfortunately, it is always the case with the introduction and development of essentially new technologies that the assessment of possible adverse consequences brought about by a nanotechnology is carried out extremely slowly. This can be partly explained by the complacency from the fact that the initial macroforms have been sufficiently well studied. However, studies of possible adverse risks for human health suggest that nanoparticles can present both direct and indirect hazards due to insufficient knowledge or flawed process development [5, 6].

Like never before with the introduction of new technologies, the principal problems are associated in this case with hygienic regulation studies for the concentration of nanoparticles in workroom air due to their extreme diversity and specificity [6]. In actual practice, what suggests itself, at least at the beginning, is the need to study the qualitative and quantitative composition of nanoparticles actually polluting workroom air in relevant industries in order to set evidence-based hygienic standards. This would, of course, requires high expenses on studies, which is undoubtedly feasible based on government financing only, especially at the stage of fine chemical production. Moreover, by way of anticipating a multi-component composition of workroom air pollutants, it seems reasonable to consider the possibility of assessing occupational health risks from pollutant combinations.

The next issue is equipment for inhalation exposures. The equipment available at research institutions dealing with sanitary and hygienic standardization of chemical substances in both workroom air and atmosphere cannot be used for creating and controlling preset concentrations of nanoparticles without special technical attachments and corresponding methodologies. Imported exposure equipment provided with nano-aerosol generators are currently too expensive and inaccessible for the majority of Russian research institutions.

The Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia is conducting work to ensure qualitative and quantitative estimation of workroom air pollution with nanoparticles at solid propellant, explosives and gunpowder production facilities which extensively employ component crushing and grinding processes. These processes are potential sources of uncontrollable nanoparticle production capable of polluting occupational environments. Moreover, these industries increasingly often use nanomaterials for improving the performance characteristics of condensed energy systems. It is assumed that exposure to nanoparticles causes a specific pattern of pathology manifesting itself in delayed or long-term consequences for the organism [7].

The hygienic standards available today for nanoparticles have been set mainly for foodstuffs. Moreover, sanitary control is proposed to be conducted in accordance with guidelines which are suitable for qualitative analysis and, sometimes, for nanoparticle identification but are little suitable, if at all, for quantitative analysis of nanoparticles, especially in air [8, 9].

In relation to large-scale production of nanomaterials, hygienic standards for nanoparticles will have to be developed for natural environments. This is where even

greater complexities are to be expected, particularly as concerns the regulation of nanoparticle concentrations in atmospheric air, water, and soil.

In fact, this is going to be just the initial phase of developments required to ensure occupational and public safety in areas affected by nanomaterial production facilities.

In parallel with nanoparticle concentration standardization to ensure occupational safety in nanomaterial production or use, other hygienic aspects should be also realized. Thus, occupational protection against undesirable effects of nanoparticles and nanomaterials on human health can theoretically be ensured by isolation from them in some form, for example, by using personal protective equipment. Today, however, there is no data on the protective efficacy of existing personal protective equipment against nanoparticles.

The above demonstrates that there are problems in the assessment and management of health risks for individuals exposed to nanoparticles occupationally in the production or use of nanomaterials.

REFERENCES

1. Filatov B.N. Sanitarno-gigienicheskie problemy obespecheniya bezopasnosti proizvodstva i primeneniya nanomaterialov / B.N. Filatov // Toksikologicheskie i normativnye aspekty proizvodstva i primeneniya nanomaterialov v Rossii: Tez. mezhdun. konf. – M., 2009. – S. 52.
2. Toksikologo-gigienicheskie aspekty problemy bezopasnosti proizvodstva produktsii na osnove nanochastits zolota / B.N. Filatov, L.P. Tochilkina, L.Yu. Bocharova, A.A. Maslennikov i dr. // Toksikologicheskij vestnik. – 2010. – №3. – S. 30-33.
3. Perspektivy razvitiya toksikologii s pozitsii nanotekhnologii i sinteticheskoi biologii / B.N. Filatov, V.I. Varenik, V.A. Nikolaev, V.V. Klauchek: Sb. tr. IV s'ezda toksikologov Rossii. – M., 2013. – S. 45-46.
4. Proizvodstvo i primeneniye nanomaterialov (toksikologo-gigienicheskie problemy) / B.N. Filatov, L.Yu. Bocharova, V.V. Klauchek, A.A. Maslennikov i dr. // Medline.ru. – Fundamental'nye issledovaniya, 2015. – T. 16, st. 22. – S. 259-266. [Online]. Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom16/art22.html>. – 14.08.2016
5. Sravnitel'no-eksperimental'naya otsenka toksichnosti nekotorykh nanomaterialov / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, M.P. Sutnikova, T.D. Degtyareva i dr.: Mater. HI Vseross. S'ezda gigienistov i sanitarnykh vrachei. – M., 2012. – T.1. – S. 452-453.
6. Hall M. Nanotekhnologii i ekologiya: riski, normativno-pravovoe regulirovanie i upravlenie / M. Hall, D. Boumen. – M: BINOM. Laboratoriya znanii, 2013. – 334 s.
7. Narusheniya postnatal'nogo razvitiya, indutsirovannye v eksperimente prenatal'nym vozdeistviem auropreparatov / L.P. Tochilkina, L.Yu. Bocharova, N.V. Khodykina, O.N. Novikova i dr. // Khimicheskaya bezopasnost' Rossiiskoj Federatsii v sovremennykh usloviyah: Sb. tr. nauch.-prakt. konf. –S-Pb., 2010. – S. 236-238.
8. Razrabotka tekhnicheskikh sredstv i metodicheskikh priemov sozdaniya aehrozolei nanomaterialov dlya provedeniya ostrykh i khronicheskikh ingyalyacionnykh toksikologicheskikh eksperimentov / V.I. Sigaev, A.D. Tolchinskii, A.V. Vorob'ev, N.R. Dyadishchev i dr. // Nanotoksikologiya: dostizheniya, problemy i perspektivy: Mater. nauch. konf. – Volgograd, 2014. – S. 55-57.
9. Gorkina I.K. Problemy sanitarno-khimicheskogo kontrolya nanochastits metallov v vode / I.K. Gorkina, I.EH. Pil'dus // Nanotoksikologiya: dostizheniya,

UDC 625.9:628.2

ECOTOXICITY EVALUATION OF EXFOLIATED VERMICULATE-BASED MAGNETIC NANOCOMPOSITE DEVELOPED FOR OIL SPILL REMEDIATION

De Morais P. C.

*Anhui University, School of Chemistry and Chemical Engineering,
Hefei, China
E-mail: pcmor@unb.br*

Magnetic exfoliated vermiculite is a synthetic nanocomposite developed to quickly and efficiently absorb oil from water bodies after oil spill. It was developed primarily to mitigate environmental pollution, but the possible adverse impact of its application in the field is now under evaluation. In this context, the present talk will address preliminary ecotoxicity evaluation of the magnetic and non-magnetic exfoliated vermiculite using genotoxic and histopathological biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*). After exposing zebrafish to magnetic and non-magnetic exfoliated vermiculite (up to 200 mg/L) DNA fragmentation, micronucleus frequency, nuclear abnormalities and histopathological alterations data were used to assess the ecotoxicity of the as developed nanocomposite. Our findings suggest that the use of magnetic and nonmagnetic exfoliated vermiculite may cause DNA damage in *D. rerio*, but the observed alterations are likely to be repaired, indicating that the nanocomposite may promote genotoxic damage, but not mutagenic effects.

UDC 613.6:615.9

CHARACTERIZATION OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO AND MEDICAL-BIOLOGICAL EFFECTS OF MULTIWALLED CARBON NANOTUBES

Fatkhutdinova L. M.

*Kazan State Medical University,
Kazan, Russia
E-mail: liliya.fatkhutdinova@gmail.com*

The number of businesses manufacturing or using carbon nanotubes (CNTs) and other carbon-based materials is constantly growing. But health-related aspects of occupational exposure to them have been investigated relatively little.

There are several ways to solve the problem of qualitative estimation of airborne CNT concentrations. Determining CNT mass concentration by determining associated metal catalyst content [1] is an indirect method. However the concentrations of metal catalysts encased in CNTs may be too low to be measurable.

Besides, metal content may depend substantially on pollutant interference [2]. It should be noted that qualitative relationships between metal content and CNT mass may be quite variable. Thermal-optical analysis makes it possible to determine elemental carbon that CNTs consist of in work zone air samples [2]. In addition, transmission electron microscopy (TEM) and other methods (e.g. nanoparticle exposure assessment using direct reading instruments) were used to characterize occupational exposure [3]. Furthermore, Russian investigators suggested to score individual CNTs directly sampled in liquid medium (deionized water) [4].

Characterizing actual exposure is essential for planning toxicological experiments including those aimed at substantiating permissible exposure limits. Investigators from Kazan State Medical University in collaboration with research group from National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) studied the levels of multiwalled carbon tubes (MWCNTs) in work zone air at a Russian manufacturing enterprise where a hydrocarbon catalytic pyrolysis reactor was used to synthesize MWCNTs. Air samples were collected in personal breathing zones using concurrently 37 mm mixed cellulose ester filters (0.8 μm pore size) and 25 mm high purity quartz fiber filters (for thermal-optical analysis).

8-hour time-weighted average concentrations for respirable size fraction in personal breathing zones ranged from 0.54 to 6.11 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (expressed as elemental carbon), and they often exceeded NIOSH-recommended level of 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. More than that, MWCNT particles were detected in the workroom air even when the equipment was shut down. The airborne MWCNTs were in the agglomerated form, the agglomerate sizes being between 1 and 10 μm . As expected, the highest work-zone concentrations of airborne elemental carbon were determined while collecting the product manually from the reactor, whereas mass concentrations of MWCNT aerosols were the lowest while collecting the samples under laboratory conditions. The data obtained are consistent with the data obtained at various enterprises by two separate research groups (from the USA [5] and Sweden [6]) using similar methodological approaches (TEM combined with thermal-optical analysis). The method of counting individual airborne MWCNTs sampled deionized water [4], as recommended in Guidelines 1.2.2639-10, was found difficult to apply, since the airborne MWCNTs were in the agglomerated form, the agglomerate sizes ranging from 0.5 to 10 μm . The study shows that national methodological approaches to assessing exposure and CNT standardization related to environmental media should be reconsidered.

Mouse experiments that we conducted revealed the profibrotic potential of incidental industrial MWCNTs, the histological pattern of fibrosis being complemented by statistically significant dose- and time-dependent elevated levels of biomarkers such as TGF- β and osteopontin both in blood serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid [7]. The epidemiological biomarker study that involved 10 industrial workers exposed to MWCNTs and 12 people comprising the control group showed that occupational exposure to MWCNT aerosols may induce changes in certain levels of fibrotic change biomarkers in blood serum and induced sputum samples. In particular, blood serum TGF- β 1 and sputum KL-6 levels were significantly dependent on exposure to MWCNTs [8]. Additionally, mRNA expression profile analysis showed significantly increased expression of genes coding

KL-6 and a number of other genes regulating its activity (IL6, EGFR, TGF β , ERK, PDGFA, CASP8). Comparing noncoding and messenger RNA expression profiles in the MWCNT-exposed and non-exposed workers revealed statistically significant differences showing that occupational exposure to MWCNTs may increase pulmonary and cardiovascular risks, as well as cancer risks, which is consistent with the data obtained in previous in vivo studies.

Without conclusive data on MWCNT safety for human health and in view of reasonable precaution, a system of preventive measures should be implemented in industrial facilities. Exposures to MWCNTs could be attenuated by means of designing closed-loop process cycles, controlling MWCNT levels in different work zones and personal breathing zones, environmental engineering, and using personal protective equipment. Biological monitoring and regular medical examinations will make it possible to detect precursory pathological symptoms and create a biobank for further investigation.

REFERENCES

1. Baron P.A. Evaluation of aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotubes material / P.A. Baron, A.D. Maynard, M. Foley // NIOSH Report. NIOSH DART – 02 – 191. – 2002.
2. Birch M.E. Occupational monitoring of particulate diesel exhaust by NIOSH method 5040 / M.E. Birch // *Appl. Occup. Environ. Hyg.* – 2002. – Vol.17. – P. 400-405.
3. Carbon nanotube and nanofiber exposure assessments: an analysis of 14 site visits / M.M. Dahm, M.K. Schubauer-Berigan, D.E. Evans, M.E. Birch at el. // *Ann. Occup. Hyg.* – 2015. – Vol.59, №9. – P.1135-1151.
4. Ispol'zovanie metodov kolichestvennogo opredeleniya nanomaterialov na predpriyatiyakh nanoindustrii: MR 1.2.2639-10. – M.: Federal'nyy Tsentri gigeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2010. – 79 p.
5. Occupational exposure assessment in carbon nanotube and nanofiber primary and secondary manufacturers: mobile direct-reading sampling / M.M. Dahm, D.E. Evans, M.K. Schubauer-Berigan, M.E. Birch at el. // *Ann. OccupHyg.* – 2013. – Vol. 57. №3. – P. 328-344.
6. Exposure and emission measurements during production, purification, and functionalization of arc-discharge-produced multi-walled carbon nanotubes / M. Hedmer, C. Isaxon, P.T. Nilsson, L. Ludvigsson at el. // *Ann. Occup. Hyg.* – 2014. – Vol.58, № 3. – P. 355-379.
7. Evaluation of fibrogenic potential of industrial multi-walled carbon nanotubes in acute aspiration experiment / T.O. Khaliullin, R.R. Zalyalov, L.M. Fatkhutdinova, A.A. Shvedova at el. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2015. – Vol.158, № 5. – P. 684-687.
8. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs / L.M. Fatkhutdinova, T.O. Khaliullin, O.L. Vasil'yeva, R.R. Zalyalov at el. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 299, № 5. – P. 125-131.
9. Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes / A.A. Shvedova, N. Yanamala, E.R. Kisin, T.O. Khailullin et al. // *PLOS ONE.* – 2016. – Vol. 11, № 3. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150628>

IN VITRO MODELS FOR THE ASSESSMENT OF SHORT AND PROLONGED EXPOSURE TO NANOPARTICLES

Fröhlich E.

*Medical University of Graz, Center for Medical Research,
Graz, Austria*

E-mail: eleonore.froehlich@medunigraz.at

Background. Nanoparticles are integrative parts of many products used in industry, food, cosmetics and medicine. The general population, therefore, is exposed to nanoparticles by various routes, out of which dermal, oral and inhalation appear to be the most important. The potential health risk by these exposures is still not completely clear. Nanotechnology is one of the leading technologies of the 21 Century and the number of engineered nanosized materials is steadily increasing. Since testing of the many nanoparticles is ethically and financially not possible the testing in physiologically relevant in vitro systems is reinforced. Assessment of nanoparticle safety is complicated mainly by uncertainties in realistic exposure levels. Additional factors include changes of particle properties (particularly dispersion and surface properties) in biological matrices, and interference of nanoparticles with detection systems. Cytotoxicity of nanoparticles has been intensely studied using conventional cytotoxicity screening. This screening uses high concentrations and measures viability of the exposed cells usually after 24h exposure. Due to concentration-dependent agglomeration of nanoparticles the effects at high doses for short times may not be predictive for cellular effects at low doses for prolonged time periods, which appears more realistic for human exposure to nanoparticles.

To improve the understanding of nanotoxicity we studied uptake and particle size and charge dependent cytotoxicity and mode of toxic action of polystyrene nanoparticles in a panel of cell lines. Effects of polystyrene particles, silica nanoparticles and short carbon nanotubes were compared in long-term (repeated doses, 4we) and short-term (single dose, 24h) culture.

Results. False positive and negative results in cytotoxicity screening assays could be prevented by inclusion of additional controls and use of more than one assay. When interference was taking place the assays could also be modified for some particles. The reaction to nanoparticles differed between cell types and from the exposure system. In the case of polystyrene particles cells growing in suspension, cells with a high proliferation rate and small cells were more susceptible to cytotoxic damage than adherent cells, slowly proliferating cells and larger cells. Exposure using aerosols increased cytotoxicity to respiratory cells compared to application of the nanoparticles as solution. The mechanism of cell death, apoptosis versus necrosis, could be linked to size and surface parameters but cytotoxicity of all nanoparticles was only weakly linked to generation of oxidative stress. Exposure systems for long-term studies had to be cell-specific and adherent endothelial and respiratory cells required different models. The exposures showed marked cytotoxicity of small polystyrene particles but relatively small effects of short carbon nanotubes.

Conclusions. Cytotoxicity of nanoparticles can be determined also in case of interference by colour, fluorescence, light scattering, etc. provided the respective controls are included and adaptation of assays are made. Physiologically relevant exposure systems produce different results from conventional cytotoxicity testing. As expected, cytotoxicity of nanoparticles after repeated exposure was higher than after short-term exposure. Carbon nanotubes with a high length to diameter ratio (aspect ratio) reacted more cytotoxic than tubes with a low aspect ratio but overall the observed cellular effects at realistic concentrations were small.

UDC 613.6:615.9

THE USE OF BIOMARKERS OF EFFECT FOR ASSESSING AND PREDICTING THE HEALTH RISK RELATED TO OCCUPATIONAL EXPOSURE TO NANOSIZED AEROSOLS AT MINING OPERATIONS

Gorbanev S. A.¹, Ellingsen D.², Thomassen Y.², Chashchin V. P.¹

*¹FBUN «Northwest Research Center of Hygiene and Public Health»
of Rospotrebnadzor, St. Petersburg*

*²The National Institute of Occupational Health,
Oslo, Norway*

Assessing the health risk associated with the exposure to ultrafine particles generated mostly from diesel exhaust has been conducted in a cross-sectional epidemiological study involving 195 healthy workers employed in open pit and underground mining companies located in the Euro-Arctic Barents Region. Workers were divided into 5 exposure groups that experienced different levels of occupational exposure to airborne particles at moderate (from +5.0 to +16.2°C) and low (from -3.5 to -13.5°C) air temperatures. The study of health risk associated with the exposure to nanosized secondary aerosol of diesel engine exhaust was focused on the chemical composition, size, number and distribution of the particles. Exposure assessment was performed by personal air sampling followed by measurements of time-weighted average concentrations of total suspended matter, organic and elemental carbon, nitrogen oxides and carbon monoxide for 2 consecutive work shifts (at least 6 hours per shift) in mines largely using mining machines equipped with diesel engines. Meteorological parameters, physical strain at work (work load) and self-assessment of thermal sensations were also measured. In addition, serum concentrations of biomarkers associated with the respiratory risk (proteins Clara cells 16 and surfactant D), cardiovascular risk and systemic inflammation (TNF α , Interleukin-6, Micro-C-reactive protein), and thrombotic risk (D-dimer, P-selectin) were measured once prior to and twice 24 and 48 hours after the last study shift. In order to adjust the biomarker concentrations for confounders such as tobacco smoking including its passive inhalation, the cotinine concentration was measured as a biomarker of nicotine intake in the morning void of urine collected after last study shift.

The results showed that the time-weighted average mass concentrations of aerosols in both open pit and underground mines were in the range 0.3-1.4 mg/m³,

which is much lower than the Russian occupational exposure limits (OELs) for mild to moderate fibrogenic dust (4-10 mg/m³). The air concentrations of carbon monoxide and nitrogen oxides in the study period also proved to be significantly lower than the OELs. However, it was found that the quantitative concentrations of suspended particles were in the range 108 – 1010 particles per m³. The expected total dose for workers was approximately 1012 – 1014 particles inhaled per shift. The highest concentrations of nanosized particulates found in the air within unprotected cabins of mining machines, equipped with diesel engines in underground mines.

Statistical analysis of the results obtained in different exposure groups showed that inhaling the nanosized aerosols in mass concentrations below the OELs can increase significantly the biomarkers levels of respiratory and cardiovascular risks, such as IL-6, TNF- α , CRP and CC 16. A close relationship does exist between the serum levels of TNF- α , IL-6 and estimated particle exposure dose expressed in the number of particles in the total volume of air inhaled per shift. In workers exposed to diesel engine exhaust at air temperatures below 0 °C, the cardiovascular risk biomarkers (TNF- α , IL-6, Micro-CRP) and thrombotic disorders (D-dimer) were significantly higher in comparison with workers exposed to similar concentrations in more favorable meteorological conditions. A statistically significant association between the biomarker of smoking intensity (cotinine excretion) and levels of respiratory and cardiovascular risk biomarkers was also found.

Thus, in addition to the OEL-based criteria currently applied for evaluating the adverse effects of aerosols, in case of predominant nanosized fractions, it is advisable to consider applying additional criteria that take into account the air concentrations expressed in the number of NPs or their total surface area. Accounting and statistical adjustment of the results for smoking intensity should be taken into account to assess the health effects related to nanosized carbon aerosols in epidemiological studies.

UDC 613.6:547.1

BIOCHEMICAL EFFECTS IN WORKERS EXPOSED TO AEROSOLS CONTAINING NANOPARTICLES GENERATED DURING METALLURGICAL PROCESSING OF COPPER

**Gurvich V. B., Katsnelson B. A., Ruzakov B. O., Privalova L. I.,
Bushueva T. V., Grebenkina S. V.**

*FBRI «Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection
of Industrial Workers» of Rospotrebnadzor,*

Ekaterinburg, Russia

E-mail: gurvich@ymrc.ru

Pyrometallurgical processes like any other metal processes involving disintegration and condensation of materials are followed by the generation of complex aerosols containing nanoparticles. Earlier it was shown experimentally that due to their large specific surface area nanoparticles are more cytotoxic and genotoxic than microparticles of the same composition [1, 2, 3].

The aim of the study is to determine particle size distribution and chemical composition of aerosols in work zone air at a metallurgical facility and to assess the biochemical effects of copper nanoparticles in the workers.

Materials and methods. An industrial copper processing facility where various production methods are used was chosen for assessment. For the purpose of the study we made a list of workplaces with similar (in our view) composition aerosols but different particle size distribution. Control group comprised the workplace of a loading operator at the copper powder plant, and experimental group comprised the workplace of a smelter at the copper wire rod plant. Pure copper produced by means of electrolysis is used to manufacture copper products in both processes. While determining the particle size distribution and chemical composition of work zone aerosols we found the highest concentration of airborne copper particles (0.77 ± 0.19 mg/m³) in the workplace of a loading operator at the copper powder plant where nanoparticle content was an average of 2.3%. The workplace of a smelter at the copper wire rod plant had the lowest concentration of airborne copper (0.098 ± 0.022 mg/m³), however the nanoparticle fraction in total amount of aerosol was close to 100 %.

While assigning the workers to groups, the following criteria were applied: male, more than 10 years of continuous record of employment, no health problems associated with the central nervous system, hepatobiliary system, renal system, no signs of alcohol addiction. The workers' health status was evaluated in accordance with order No302n of the Ministry of Health Care and Social Development of the Russian Federation dated 12.04.2011 (revised edition dated 05.12.2014). Additionally, the following biochemical indicators were measured: blood copper level, urine copper level, caeruloplasmin, alkaline phosphatase, total protein levels in blood, serum creatinine, creatine phosphokinase, S100 proteins, neural-specific enolase, microalbumin level in urine.

Results and discussion. The workers examined were found to have statistically significant changes in the biochemical indicators: a strong direct correlation between elevated caeruloplasmin levels and raised airborne nanoparticle concentration ($r = 0.971$). The fact that the copper nanoparticles had a higher impact than that of total amount of copper in the aerosol was confirmed by the same blood copper levels in the workers from both groups (14.08–15.37 mg/L, the difference is not statistically significant) and serum caeruloplasmin levels (that account for 95 % of total copper levels in serum). The experimental group showed substantially higher blood caeruloplasmin levels (301.37 ± 28.70 mg/L) compared to those of the control group (168.82 ± 18.77 mg/L). It should be noted that the control group was exposed to the aerosol at the lowest copper concentration but the proportion of the nanoparticles was the highest. All the differences in caeruloplasmin levels between the groups were statistically significant (Student t-test $p < 0.05$).

Despite the fact that there were no statistically significant intergroup differences in the other biochemical indicators it should be pointed out that strong correlation was found between airborne copper concentrations and biochemical nerve tissue indicators such as S100 protein level and neural-specific enolase activity. These differences can be explained by different exposures of the groups to aerosol

nanoparticles. Therefore one might suggest that the contribution to copper level in the body exposed to the aerosol depends substantially on the proportion of copper nanoparticles in the aerosol rather than on total exposure to copper. The regularity revealed can be explained by high dissolution rate of nanoparticles due to their larger surface area compared to their bigger counterparts

Conclusions. 1. Metallurgical workers exposed to copper aerosols with higher proportion of nanoparticles were found to have statistically significant elevated blood caeruloplasmin levels, it stands to mention that it is the content copper compounds in the form of nanoparticles that is of special importance, not just total copper concentration in the work zone air. 2. When workers were exposed to higher amounts of copper nanoparticles, we observed effects that could indirectly indicate altered copper biokinetics in the body and possible adverse organ or system effects, which requires further investigation.

REFERENCES

1. Experimental data pertaining to pulmototoxicity and absorptive toxicity of particles of magnetite (Fe₃O₄) within nano- and micrometric ranges / Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyaryova T.D. et al. // *Toksikologicheskiy vestnik*. – 2010. – №2. – P. 17-24.

2. Katsnelson B.A. About the validation of the tentative safe exposure level of the metalcontaining nanoparticles impact in occupational air / Katsnelson B.A., Privalova L.I., Degtyaryova T.D. et al. // *Toksikologicheskiy vestnik*. – 2012. – №4. – P. 26-29.

3. Biologicheskaya aktivnost' nanochastits medi / O.A Bogoslovskaya, T.A. Baytukalov, N.N. Glushchenko i dr. // *Novaya tekhnologicheskaya platforma biomeditsinskikh issledovaniy (biologiya, zdravookhranenie, farmatsiya): tez. dokl. nauch.-prakt. konf.* – Rostov-n/D., 2006. – P.71–72. UDC 615.9

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF MULTIWALLED CARBON NANOTUBES

Gusev A. A.^{1,2,3}, Vasyukova I. A.¹, Zakharova O. V.¹, Tkachev A. G.⁴

¹ *Tambov State University
Tambov, Russia*

² *State Technological University «Moscow Institute of Steel and Alloys»
Moscow, Russia*

³ *National Research Tomsk State University
Tomsk, Russia*

⁴ *Tambov State Technical University
Tambov, Russia*

E-mail: nanosecurity@mail.ru

At present little is known about environmental impact of multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). We have conducted a comprehensive ecotoxicological study of Taunit MWCNTs (developed at NanoTechCentre, Tambov) using a wide range of test organisms: various functional groups: saprotrophs (bacteria) *Escherichia coli*

(Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919, *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887, *E. coli* M-17 (Ecolum test system); aquatic autotrophs and heterotrophs: phytoplankton (*Scenedesmus quadricauda* microalgae (Turpin) Brébisson, 1835) and zooplankton (crustacean *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900, larval *Chironomus riparius* Meigen, 1804); terrestrial autotrophs (higher plants such as *Onobrychis arenaria* (Kit) Ser. 1825) and heterotrophs (mammals such as *Mus musculus* Linnaeus 1758, C57B/6×DBA2 hybrid mice).

An experimental model was developed to describe MWCNT exposure in bio-objects by obtaining aqueous suspensions. Potential hazard of MWCNTs was assessed. The biological effects of MWCNTs compared to those of carbon black were shown to be different due to specific structure of these carbon-based materials. No-effect MWCNT concentration was established for bacteria and aquatic organisms in aquatic compartment. MWCNT exposure mechanisms were studied for higher plants. The study of oral exposure to MWCNTs revealed hepatotoxicity, nephrotoxicity, pneumotoxicity and reproductive toxicity in laboratory mice. Scientific and methodological foundations were established to determine MWCNT tolerance ranges for the bio-objects and environmentally sound standards were developed for different environmental compartments.

UDC 613.31:628.162]-078

NANOPARTICLES OF IDENTICAL COMPOSITION BUT DIFFERENT SIZES INDUCE GENETIC INSTABILITY THROUGH QUALITATIVELY DIFFERENT MECHANISMS

Ingel F. I.

*A.N. Sysin Research Institute of Human Ecology And Environmental Health
of Ministry of Health of Russian Federation,
Moscow, Russia
E-mail: fainaingel@mail.ru*

Now the fact that exposure to nanoparticles (NPs) in vitro, ex vivo and in vivo induces genotoxic effects can be considered proven. Among numerous publications on this subject, there are several studies describing genotoxic effects of exposures to nanoparticles of identical composition produced using the same technologies but of different sizes, these exposures resulting in the same genetic damage, but different in the level of the effects. But it is still an open the question whether NPs with different sizes induce genotoxic effects through the same mechanism, which seems to be strange due to the multiplicity of known NPs-induced mechanisms of genotoxicity [1].

Using molecular methods it was demonstrated that the resulting genotoxic effects may be qualitatively similar if not identical if they are induced by different-size NPs [2-4]. However, qualitatively different types of induced genetic damage that leads to genomic instability depending on particle size have not been identified so far.

Materials and Methods. Whole human blood was incubated with Cytochalasin B (micronucleus assay) and 0.005 – 5.0 mg/L of gum arabic-stabilized silver NPs with particle sizes of 14.3 ± 0.2 nm (Ag14) and 100.0 ± 11.0 nm (Ag100). Gum arabic in its higher concentration and Ag ions were used as additional controls.

The extended protocol of cytome analysis [5] including standard indices – frequencies of binuclear cells (BN) with micronuclei (MN) and nucleoplasmic bridges (NB) and a number of additional indices identifying the spectrum of cellular proliferation (by the frequencies of mono-, bi-, tri-, tetra- and other multinucleated cells), frequencies of each type of cells with MN and/or NB, frequencies of symmetrically and asymmetrically divided cells among cells of the 2nd mitosis, the frequencies of mitosis and apoptosis, proliferative pool etc.

Results. The effects of genomic instability determined by the frequencies of micronucleated and bridged cells, as well as mitotic activity deceleration and decreased proliferative pool changed in the following sequence: Ag+ >> Ag100 >> Ag14. Conversely, increased asymmetric trinucleated cells frequency (the aneuploidy marker – the effect underlying tumor formation) was found to be more typical for cultures exposed to Ag14 and was dose-dependent. This effect was observed for the first time. It proves the possibility of induction of essentially different types of genomic instability by qualitatively different mechanisms when exposed to NPs of the same composition but different sizes.

In addition, the proof that silver NPs cannot be used to disinfect drinking water as it was supposed before due to silver NP`s high bactericidal activity is to be considered as an applied result of this study.

REFERENCES

1. Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics / Th. Verano-Braga, R. Miethling-Graff, K. Wojdyla, A. Rogowska-Wrzesinska et al. /ACS Nano. – 2014. – Vol.8 (3). – P. 2161-2175.
2. Hay R.T. SUMO: a history of modification / R.T. Hay // Mol. Cell. – Vol. 18 (1). – 1-12.
3. The Influence of Proteins on the Dispersability and Cell-Biological Activity of Silver Nanoparticles / S.C.G. Kittler, J.S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel et al. // J. Mater Chem. – 2009. – Vol.20. – P. 512-518.
4. Huang Chong-xin Protein Phosphatase 2A Mediates Oxidative Stress Induced Apoptosis in Osteoblasts / Huang Chong-xin, Lv Bo, Wang Yue //Mediators Inflamm. 2015. – Vol. 11. – Article ID 804260. – 8 p.
5. Electrochemically activated water induced effects of genomic instability in various living objects in vitro and in vivo / F. Ingel, O. Zatsepina, A. Stekhin, G. Yakovleva et al. // Occup. Med. Health Aff. – 2013. – Vol. 1. – Iss.7, 143. – P. 1-7.
6. Main results of toxicological experiments in vivo with some metal and metal oxides nanoparticles / Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B. et al.// Toksikologicheskiy vestnik. – 2015. – №3. – P. 26-40.

THE COMBINED EFFECTS OF NANOSCALE CARBON DUST AND RADIATION ON LIPID PEROXIDATION IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Kashanskiy S. V.¹, Ilderbaev O. Z.², Chulenbaeva L. E.²

¹*Federal Budget Establishment of Science «Yekaterinburg Medical Research Center Prevention and Occupational Health of Industrial Workers»,
Yekaterinburg, Russian Federation;*

²*L.N. Gumilyov Eurasian National University,
Astana, Republic of Kazakhstan
E-mail: hlhdmrc@ymrc.ru*

Numerous studies have recently demonstrated the important role of reactive oxygen species (ROS) in pulmonary damage induced by tissue factors especially in occupational pathology [1].

When phagocytic cells interact with nanoscale dust particles, ROS production may increase as these particles are not affected by ROS. ROS overproduction may damage the cells and nuclear structures due to oxidative modifications in proteins, lipids and nucleic acids [2].

Literature analysis has shown that 0.19 nm carbon nanoparticles are the most hazardous for human health [3].

The studies of occupational exposure carried out at energy sector facilities have established that mitochondrial dysfunction that is marked by inhibited respiratory chain enzyme activity induces morphofunctional and metabolic alterations caused by the hypoxia-inducible factor. Then organs and tissues undergo dystrophic changes that ultimately result in occupational pulmonary diseases [4].

Taking into account the essential part of oxidative and metabolic processes in developing pathologic processes, their lability, high sensitivity and the adverse effects caused by their disruption, we find it interesting to study their role in developing abnormalities in animals after combined exposure to mostly nanoscale coal dust and sublethal irradiation. Hence our aim is to study experimentally the role of free-radical oxidation in adrenal tissues, immunocompetent organs and cells after combined exposure to sublethal gamma-radiation dose and nanoscale coal dust.

For this purpose, 4 sets of experiments were carried out on 200-250 g. male white rats divided into 4 groups: group I comprised intact rats, group II comprised rats exposed by inhalation to coal dust at average concentration of 50 mg/m³ in exposure chamber пылевой камере for 12 weeks (q.d., 4 hours per day), group III comprised rats gamma-irradiated at 6 Gy dose and group IV comprised rats exposed to a combination of coal dust and gamma-radiation. To induce experimental anthracosis the rats were put in the inhalation exposure chamber.

Group III and IV rats were exposed to a single dose 0.2 Gy gamma-radiation 90 days before the measurement using TERAGAM Co⁶⁰ radiotherapy unit. Lipid peroxidation products (LPP) in organs and cells of the animals were identified. For that purpose, lymphocytes were isolated from peripheral blood, homogenates were prepared from liver, spleen, thymus, as well as small intestinal and adrenal lymph

nodes. Their conjugated diene (CD) and malondialdehyde (MDA) content was determined. The data obtained were processed by means of the traditional analysis of variance using Student's t-test.

Exposure to coal dust particles increased CD levels from 0.28 ± 0.02 to 0.35 ± 0.02 ($p < 0.05$) in peripheral blood lymphocytes, from 0.48 ± 0.04 to 1.02 ± 0.14 in thymus ($p < 0.05$). After the rats had been exposed to gamma-radiation, CD levels in the lymphocytes and thymus were unchanged ($p > 0.05$). After combined exposure to dust and radiation, CD levels were 1.2 times higher in the lymph cells ($p < 0.001$) and in thymus they equalled controls, but tended to increase by 8.33% ($p > 0.05$).

Small intestinal lymph node CD levels in group II rats exposed to coal dust increased 3.08 times from 0.36 ± 0.03 to 1.11 ± 0.10 ($p < 0.001$) and in group IV rats – 1.83 times from 0.66 ± 0.05 ($p < 0.001$). Statistically significant 75.0% CD increase was observed in liver homogenates ($p < 0.05$) in rats exposed to coal dust, while combined exposure to coal dust and radiation elevated CD levels by 23.52 % from 0.68 ± 0.05 до $0,84 \pm 0,06$ ($p < 0.05$). Group II and III animal adrenal lymph nodes did not show any significant changes. However DC levels decreased 2.41 times ($p < 0.001$). Spleen DC levels were virtually unchanged in all the four groups.

In terms of MDA levels, lipid peroxidation observed in rats exposed to coal nanoparticles, gamma-radiation or both was quite intense. After exposure to coal dust particles, MDA levels increased by 50.0% in peripheral blood lymphocytes ($p < 0.05$). In response to 0.2 Gy gamma-radiation, MDA levels remained the same as those in the control group ($p > 0.05$).

Liver homogenate MDA levels were elevated by 38.46% ($p < 0.05$) after exposure to coal dust, by 69.23% ($p < 0.01$) after combined exposure, however, an insignificant MDA increase was observed after gamma exposure.

Consistent increase in MDA levels was detected in the other groups. Thus, after nanoscale coal dust exposure alone MDA concentrations in small intestinal lymph nodes increased by 60.0% ($p < 0.05$), after gamma exposure they increased by 40.0% ($p < 0.05$) and after combined exposure (group IV) the increased by 80% ($p < 0.05$). Lipid peroxidation intensified in thymus homogenate, which manifested itself in higher MDA content compared to that of controls. MDA concentrations were 38.9% higher in group II ($p < 0.05$), 11.1% higher in group III ($p > 0.05$) and 61.1% higher in group IV ($p < 0.01$).

Similar dynamics was observed in adrenal homogenate: 36.4% increase in group II ($p < 0.05$), 13.6% increase in group III ($p > 0.05$) and 77.3% in group IV ($p < 0.05$). Oxidative stress is an important pathogenetic contributor to many diseases (including occupational diseases) where ROS display their toxicity resulting from increased production of ROS and impaired antioxidant defense system. The significance of oxidative metabolism activation and weakening antioxidant defense system in the coniosis inflammation pathogenesis, early pneumoconiosis and during post-exposure period has been established [5].

The experimental study revealed the activation of lipid peroxidation in laboratory animal organs, which was marked by elevated levels of MDA and CD.

The changes observed are indicative of antioxidant defense system imbalance in immunocompetent organs in rats exposed to radiation and non-radiation, with combined exposure effects being more pronounced in terms of statistic significance

Further investigation of combined health effects of radiation and non-radiation factors as well as taking measures to attenuate their adverse effects are suggested.

REFERENCES

1. Velichkovskiy B.T. Novye predstavleniya o patogeneze professional'nykh zabolevaniy legkikh pylevoy etiologii // Pul'monologiya. – 1995. - № 1. – P. 6-16.

2. Ufimtseva L.V., Antipova N.S., Koltsova E.E. The dust nanoparticle distribution in the air of khabarovsk residential territory under the atmospheric precipitation influence // Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. Meditsina i zdravookhranenie. – 2015. - № 5. – P. 50-53.

3. Dubinina E.E., Shugaley I.V. Okislitel'naya modifikatsiya belkov // Uspekhi sovremennoy biologii. – 1993. – Vol. 113, № 1. – P. 71-81.

4. Fomenko D.V., Gorokhova L.G., Panev N.I., Kazitskaya A.S., Bondarev O.I. Clinical and experimental researches of metabolic response of an organism to chronic exposure to coal dust // Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya. – 2011. - № 2. – P. 15-21.

5. Cheres P., Kim S.-J., Tulasiram S., Kamp D.W. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. Biochimica et Biophysica Acta. – 2013. – Volume 1832, № 7. – P. 1028-1040.

UDC 615.9

SOME GENERAL PATTERNS AND SPECIFIC ASPECTS OF METAL NANOPARTICLE COMBINED TOXICITY (EXPERIMENTS AND MATHEMATICAL MODELLING)

**Minigalieva I. A.¹, Katsnelson B. A.¹, Privalova L. I.¹, Sutunkova M. P.¹,
Valamina I. E.², Shur V.Y.³, Shishkina E. V.³, Makeev O. G.³,
Varaksin A. N.⁴, Panov V. G.⁴**

¹*FBRI «Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection of Industrial Workers» of Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russia*

²*Central Research Laboratory at the Ural State Medical University,
Ekaterinburg, Russia*

³*Ural Centre for Shared Use «Modern Nanotechnology», Ural Federal University,
Ekaterinburg, Russia*

⁴*Institute of Industrial Ecology of the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russia
E-mail: ilzira@ymrc.ru*

In experiments on outbred female white rats we studied toxicity of several metal oxide nanoparticles (NPs) separately and in different combinations (NiO+Mn₃O₄; CuO+PbO; CuO+ZnO; PbO+ZnO; PbO+CuO+ZnO) using two experimental models: (a) a single intra-tracheal instillation in low doses 24 hrs before

the broncho-alveolar lavage to obtain a fluid for cytological and biochemical investigation; (b) repeated intra-peritoneal injections during 6 weeks in non-lethal doses to assess the subchronic intoxication thus induced with a lot of functional and morphometric indices and with indices for distribution and elimination of respective metals. The combined effects were described by different mathematical models including the Response Surface Methodology.

We demonstrated a diversity of combined toxicity types for one and the same pair of NPs depending on the particular effect which this type is assessed for and often also on the effect's dose-dependent level. A risk-oriented approach to classifying the three-factorial toxicity developed earlier for the combined action of metals in ionic-molecular form proved adequate for the studied NPs too.

UDC 57

NEUROBIOLOGICAL EFFECTS OF NANOSCALE AEROSOLS

Moshkin M. P.

*FRC Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Federal Shared-Access Center «Center for Genetic Resources of Laboratory Animals»,
Novosibirsk, Russia
E-mail: mmp@bionet.nsc.ru*

The relevance of biological and biomedical study of submicron and nanoscale aerosols is depends on: (a) their potential toxicity, (b) the possibility (feasibility) of new diagnostic markers, (c) their prospective application in targeted drug delivery.

In order to study the intracerebral accumulation/elimination dynamics of nanoparticles (NPs), mice were exposed intranasally to magnetic resonance contrast Mn_2O_3 NPs detected by magnetic resonance imaging (MRI). Kinetic calculations based on Weibull cumulative distribution functions showed that NP accumulation and elimination dynamics depend on various processes. In addition, the peak time for cerebral structures varied between 12 and 170 hours and between the peak time and the number of synaptic transmissions that the NPs passed through. Brain tissue of mice was studied by electron microscopy after intranasal exposure to high electron density platinum oxide NPs, which made it possible to prove that intranasal exposure results in NPs accumulating only in the intracellular compartment. This result raises the question of NP-intracellular protein interaction. Proteomic analysis of proteins treated with various NPs during cytoplasmic incubation revealed that the proteins include intrinsically disordered proteins which are known to be involved in stress granule formation inducing neurodegenerative diseases.

Potential hazard associated with NPs entering the brain is partially compensated by the congruence of nonuniform NP deposition and uptake on the olfactory epithelium (OE) surface. Olfactory receptor knobs in OE dorsal region, the most NP-bombarded part of OE, are characterized by lower uptake capability than OE ventral region. Even more effective aerodynamic defense mechanism preventing

NPs from entering the brain was discovered while comparing mice to northern mole voles digging soil with the help of their large incisors. The amount of NPs deposited per OE surface unit in northern mole voles was 6 times higher than that of mice.

Potential neurobiological risks of nano-biointeractions are not limited by their accumulation in cerebral structures. Mice experiments showed that NPs of certain metal oxides with proton sponge properties decrease body temperature by 5-6 °C within 90 minutes after intranasal exposure. The mechanism of hypothermic action is linked to OE intracellular acidification that induces signalling pathway resulting in lower hypothalamic set point.

Thus, NP deposition in the nasal cavity triggers a set of neurobiological processes whose pathogenic significance requires in-depth study including animal lines susceptible to neurodegenerative diseases the incidence of which is reported by toxicological studies to depend directly on the concentration of nanoscale aerosols in the air.

UDC 615.9

SOME PRINCIPLES OF AND MEANS FOR INCREASING ORGANISM'S RESISTANCE TO ADVERSE EFFECTS OF METALLIC NANOPARTICLES

**Privalova L. I.¹, Katsnelson B. A.¹, Gurvich V. B.¹, Minigalieva I. A.¹,
Sutunkova M. P.¹, Makeyev O. H.², Valamina I. E.², Shur V. Y.³, Grigoryeva E.
V.¹, Klinova S. V.¹, Shishkina E. V.³**

¹ *The Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russia;*

² *The Central Research Laboratory, The Ural State Medical University
Ekaterinburg, Russia;*

³ *Ural Center for Shared Use «Modern nanotechnologies», Ural Federal University,
Ekaterinburg, Russia
E-mail: privalova@ymrc.ru*

Especially high health risks associated with impacts of metallic and metal oxide nanoparticles (Me-NPs) as well as their presence in the working environments of not only the nano-industry but also of some long-existing technologies make it necessary, along with keeping respective noxious exposures as low as possible, to look for ways of increasing the organism's resistance to them. Theoretical premises of such «bio-protection» are briefly discussed in this paper. Summing-up the relevant results of the experiments with different Me-NPs, this self-overview demonstrates that against the background of adequately composed combinations of some bioactive agents used in innocuous doses, the integral and specific toxicity of metallic nanoparticles and even their genotoxicity can be markedly attenuated.

STUDY OF THE CYTOTOXIC PROFILE OF MANGANESE OXIDE (II, III) AND NICKEL OXIDE (II) NANOPARTICLES ON HUMAN FIBROBLAST CULTURE

**Proshchenko D. A.¹, Dorofeeva N. V.^{1,2}, Shambatov M. A.¹,
Melekhin V. V.¹, Makeev O. G.¹**

¹*Federal state budgetary educational institution of higher education «Ural State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Yekaterinburg, Russia;*

²*Federal state autonomous educational institution of higher education
«Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin»
Yekaterinburg, Russia;
E-mail: dorofeeva.nadin@gmail.com*

In spite of the fact that nanoparticles have been used in the world for more than a decade, none of the types of these particles has been fully studied for safety. Given this fact and the inapplicability of the traditional approach to toxicity evaluation, major international organisations recommend using human cell cultures for studying the toxicity of nanoparticles in vitro [1].

Materials and methods. In this study, we used lines of cultivated human fibroblasts, passage 4-7. Cells were grown by an original technique [2].

For constructing the intact fibroblast growth curve, in three days we counted the number of cells with the help of a Fuchs-Rosenthal chamber. Repeat sampling was performed every 3 days.

To analyse dia. 30-60 nm nanoparticles obtained by laser ablation at the Ural Center for Shared Use «Modern Nanotechnologies» (Ural Federal University) for a possible cytotoxic effect, cells were plated to grow a cell culture. On day 9, a suspension of nanoparticles was added in a concentration of 0.01, 0.05 and 0.1 mg/ml, and the cells were incubated with a change of the medium and cell count every 3 days. The resulting data were used to construct «cell count/cultivation days» curves in comparison with the intact fibroblast growth curve.

Changes in the mitochondrial activity of the cells were then determined using the MTT-assay, which was performed by the standard technique [3] using a TOX1 test system (Sigma Aldrich) in accordance with the manufacturer's guidelines. The results of the test were estimated by determining the index of cytotoxicity (IC) by the formula:

$$IC = \left(1 - \frac{OП_0}{OП_K}\right) \times 100\% [7],$$

Where:

$OП_K$ is the optical density of the control group solution,

$OП_0$ is the optical density of the experimental group solution.

The index of cytotoxicity is an index of inhibition calculated as a percentage of non-viable cells in the culture.

Twelve days after the start of the experiment, we performed a morphological examination of the cells after the addition of the nanoparticles with preliminary Romanowsky staining.

For estimating the significance of the differences between the groups we used the Mann-Whitney test. For the error probability of $p < 0.05$, the differences between the mean values were assumed to be reliable.

Results and discussion. The data show that the number of cells decreased compared with the controls as early as on the 3rd day after the addition of the manganese oxide nanoparticle suspension in a concentration of 0.01 mg. A significant drop in the number of cells was observed after the addition of the nanoparticle suspension in a concentration of 0.05 mg/ml. The highest cytotoxicity was demonstrated by manganese nanoparticles in a concentration of 0.1 mg/ml. By day 6, the number of cells reduced 2.5-4 times, which seems to be due to the prevalence of apoptosis and necrosis over mitosis. Single attached cells with strongly vacuolated cytoplasm were observed. On day 9, all of the culture died (figure 1).

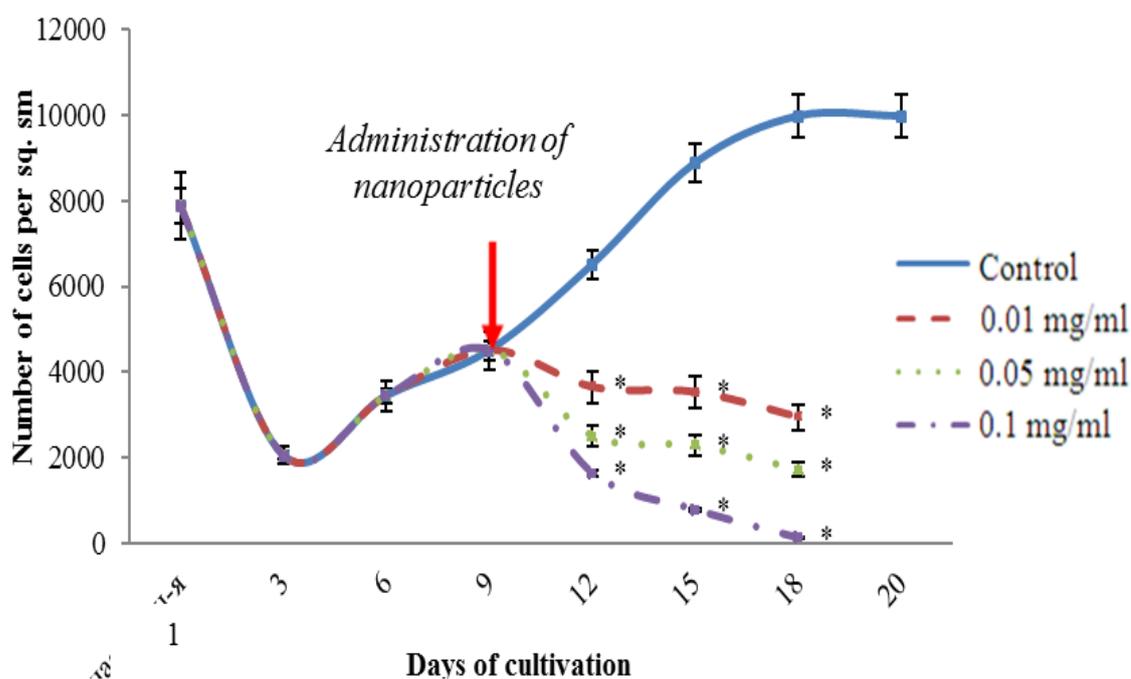


Figure 1. The cell density of the fibroblast culture after administration of manganese oxide nanoparticles

After the addition of the nickel NP suspension in a concentration of 0.01, 0.05 and 0.1 mg/ml, we observed a decrease in the number of cells as early as on the 3rd day of the experiment. Nickel nanoparticles demonstrated the highest cytotoxicity in a concentration of 0.1 mg/ml. On day 6, the number of cells decreased 4-5 times in comparison with the controls, and the cultures were completely dead (figure 2).

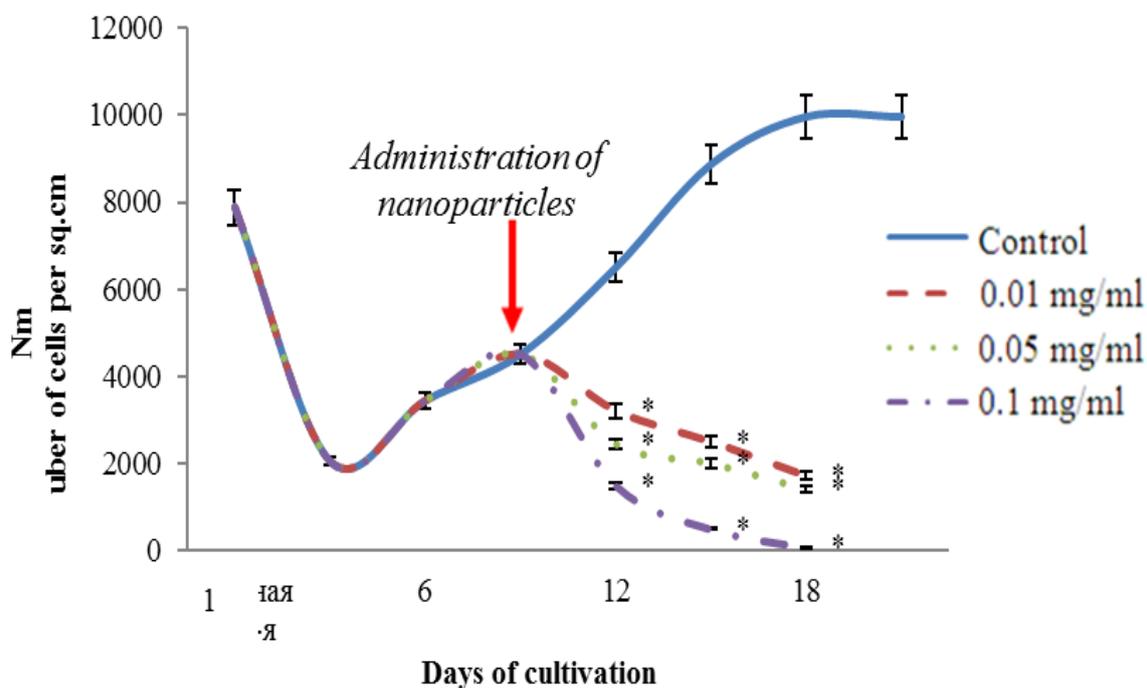


Figure 2. The cell density of the fibroblast culture after administration of nickel oxide nanoparticles

According to the MTT assay, a higher cytotoxic effect on the human fibroblast cell culture was associated with the addition of nickel oxide (II) nanoparticles in comparison with the addition of manganese oxide (II, III) ones, which manifested itself as reduced mitochondrial activity (figure 3).

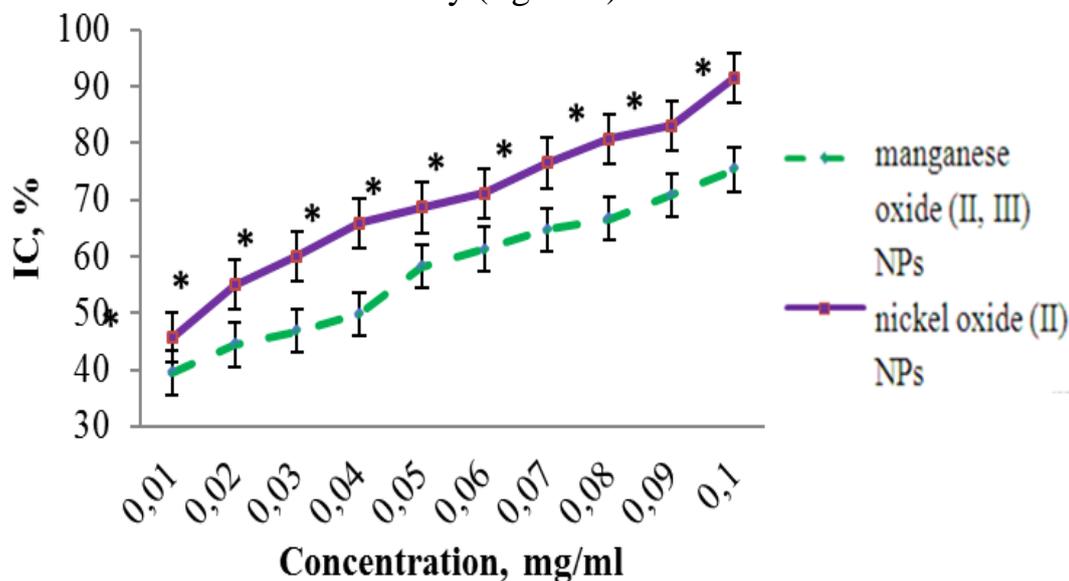


Figure 3. Dependence of IC on nanoparticle concentration as per MTT

The results of this study suggest that the effect of the nanoparticles tested is associated with the inhibition of mitochondrial dehydrogenases, including NADH-dehydrogenase which plays a key role in the processes of cell respiration and oxidative phosphorylation.

Based on the morphological analysis, we have found that nanoparticles feature high toxicity and are capable of penetrating through cell barriers, the toxicity of nanoparticles is determined by their shape and size, and a marked dose-dependent effect is observable.

Conclusions. 1. Manganese and nickel nanoparticles in a concentration of 0.01, 0.05 and 0.1 mg/ml display marked cytotoxicity.

2. The highest cytotoxicity was shown by nickel nanoparticles in a concentration of 0.1 mg/ml.

3. Increasing the concentration of manganese and nickel oxide nanoparticles accelerates the differentiation of the fibroblastic differon cells with their subsequent death in comparison with the control group.

REFERENCES

1. Vasil'eva M.S., Makeev O.G., Korotkov A.V. Metodologiya otsenki toksichnosti nanochastits // Vestnik ural'skoi medicinskoj akademicheskoi nauki. – 2012. - № 3. – S. 62-64.

2. Makeev O.G., Ulybin A.I., Zubanov P.S. Patent № 2345781 «Sposob polucheniya kul'tury kletok kozhi» // Byulleten' izobretenii. – 2009. - № 4.

3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // J. Immunol. Meth. – 1983. – V. 65, № 1–2. – P. 55–63.

UDC [615.46.014.47:615.28]:546.26

EFFECTIVE AND SAFE MODIFIED CARBON SORBENTS BASED ON NANOGLOBULAR CARBON FOR MEDICAL AND VETERINARY APPLICATION

Pyanova L. G.^{1,2}, Sedanova A. V.¹, Likholobov V. A.^{1,2}

¹*Institute of Hydrocarbon Processing of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Omsk, Russia*

²*Omsk State Technical University,
Omsk, Russia*

E-mail: medugli@ihcp.ru

At present there is a wide range of pharmaceutical and medical products that differ in exposure types, efficacy and uses. Developing new safer and more potent products (pharmaceuticals, medical products) is currently quite essential though the cost has to be taken into account.

Quality and safety requirements for the products are specified at the development and production stages using materials conforming to medical requirements. Quality requirements are based on standards and technical specifications.

Their safe use is determined by eliminating the following hazards: exposure to trauma (mechanical, thermal, chemical, etc.); release of hazardous substances

including toxic, carcinogenic, mutagenic substances, allergens, et cetera; specific side effects and contraindications associated with specific properties of certain drugs; drug dependence and drug withdrawal syndrome.

The issues of environmental safety of drugs and medical products are considered in the process of their manufacturing, transportation, storage, recycling, use and disposal.

The Institute of Hydrocarbon Processing of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences has developed engineering approaches to tailor-made synthesis of new porous carbon-carbon materials based on nanoglobular particulate carbon (particle diameter is in the range of 40-60 nm) and medical sorbents based on them: VNIITU1 carbon hemosorbent in sterile saline and VNIITU2 gastrointestinal adsorbent. The synthesis involves two-stage transformation of carbon which results in nanodispersed carbon particles and pyrocarbon.

Medical and veterinary drugs that come into contact with biological fluids must comply with particular requirements for quality: high chemical purity, minimal impurity content, nontoxicity, high mechanical performance and smooth surface of the granules, no dust generation (no release of ultrafine particles), high sorptive capacity for the substances to be eliminated, biocompatibility, et cetera. The new nanoglobular carbon-based materials are safe and effective.

Currently the primary task is to create biospecific sorbents with high adsorptive capacity for toxic substances, including proteins, that accumulate in case of certain diseases (cancers, immunologic and infectious diseases, etc.). It can be achieved by (chemical) surface modification of carbon using organic acids, enzymes, proteins, etc. Organic substances with oxygen- and nitrogen-containing functional groups (carboxylic, amide, amine groups, etc.) are of particular interest in terms of carbon surface modification.

Carbon sorbents are promising materials (carriers) to modify in order to develop and produce pharmaceuticals both for human and animal use. Methods of (chemical) carbon sorbent surface functionalization using oxygen- and nitrogen-containing modifiers make it possible to create a wide range of effective medical sorbents with selective adsorptivity capacity for pathological protein compounds (proinflammatory cytokines, hepatitis virus particles, viral and bacterial byproducts, etc.)

In veterinary medicine, broad spectrum gastrointestinal carbon adsorbents containing bioactive substances show most potential. These products can be used to treat immunological, metabolic, gastrointestinal pathological conditions, improve natural and specific immunity, promote animal growth and reproductive capacity.

Synthesizing molded carbon sorbents for application medicine and studying their physicochemical, as well as medical and biological properties are the areas of research that the Institute of Hydrocarbon Processing has been recently developing.

Carbon sorbents developed at the institute are used extensively in human and veterinary medicine. The paper covers the main areas of medical and veterinary carbon sorbent development, and the study results of physicochemical, as well as medical and biological properties which confirm the efficacy and safety of these sorbents.

TENTATIVE HYGIENIC STANDARDS FOR NANOPARTICLE AEROSOLS IN WORKROOM AIR AND PREEMPTIVE RISK ASSESSMENT

Radilov A. S., Glushkova A. V., Dulov S. A., Rembovsky V. R.

*Federal state unitary enterprise «Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology» of the Federal Medical and Biological Agency,
Saint-Petersburg, Russia
E-mail: gpech@fmbamail.ru, niigpech@rihophe.ru*

The probability of adverse consequences due to the effect of nanoparticles for the environment and public health is known to be determined by potential hazard, one the characteristics of which is the toxicity of the substance or substances that are among the constituents of the material that interacts with living organisms [1].

The toxicity of a lot of the nanoparticles known to date considerably exceeds that of the known micro- and macro-particles [2, 3, 4].

We propose margins of safety in accordance with variant of toxicity manifestation for corresponding routes of exposure. The proposed margins of safety are based on the concept of nanoparticle bioavailability depending on the route of entry. In so doing, it is necessary to take into account that a substance would feature low bioavailability and, accordingly, its margin of safety would be equal to 1 in the case of identical toxicity indices under intragastric and intraperitoneal exposure irrespective of its class of hazard.

These margins of safety as presented in Table 1 may be used for calculating and justifying hygienic standards and for assessing the influence of occupational nanoaerosols on human health.

Table 1 – Determination of safety margin according to the variant of toxicity

Variant No	Relationship between the toxicities of nano- and microparticles for corresponding routes of exposure			Safety margin
	intragastric	intraperitoneal	intratracheal/ inhalational	
1	$T_H \cong T_M \geq 5 \text{ г/кг}$	$T_H \leq T_M$	$T_H \cong T_M$	1
2	$T_H \cong T_M$	$T_H > T_M$	$T_H \geq T_M$	10
3	$T_H > T_M$	$T_H > T_M$	$T_H > T_M$	50

Notes: T_H – nanoparticle toxicity
 T_M – toxicity of microparticles of the same substance
 \cong \cong – approximately equal to

We suggest using as the basis for calculating tentative hygienic standards for NPs in workroom air the formulas given in [5] and [6] for calculating metal aerosol MACs:

$$(1) \text{ ПДК}_{\text{рз}} (\text{мг/м}^3) = 0,0008 \times \text{DL} 50 (\text{мг/кг}) [4]$$

and for the aerosols of metal oxides and other metal compounds:

$$(2) \log \text{ПДК} (\text{мг/м}^3) = 0,85 \log \text{LD}_{50} (\text{мА/кг}) - 3,0 + \log M - \log N \quad [4, 5]$$

Where:

LD₅₀ is the lethal dose for 50 % of mice for intraperitoneal administration and a weekly period of observation expressed as milliatoms per kilogram weight;

N is the number of atoms of the metal in a molecule of the substance;

M is molecular weight.

For calculating the workroom MACs for nanoparticles we suggest using the proposed equations (formulas 1 and 2) taking into account margin of safety (table 1).

It is known that, where experimentally confirmed values of LD₅₀ are available for various routes of exposure to a substance, use is made of minimum LD₅₀ values assuming the most adverse prediction and based on a choice of corresponding safety margin.

Below is an example of how a tentative hygienic standard is calculated for copper nanoparticles:

LD₅₀ copper nanoparticles = 413 mg/kg

$$\text{ПДК}_{\text{рз}} \text{ НЧ меди} = \frac{0,0008 \times 413}{50} = 0,007 \text{ мг/м}^3$$

We have calculated predicted MAC values and risks for workroom air for some nanoaerosols taking into account the proposed approach, which are presented in table 2.

Table 2 – Predicted MACs for some nano- and micro-aerosols

Substance	Animals /route of exposure	LD ₅₀ (mg/kg) NP	LD ₅₀ (mg/kg) MP	ПДК _{р.з.} MP (mg/m ³)	Predicted workroom MAC for NP (mg/m ³)
Ag	rats intraperitoneal	5000 [8]	not achieved	1 [7]	0.08
Cu	rats intragastric	413 [9]	5000 [12]	1 [7]	0.007
TiO ₂	rats intragastric	12000 [10]	not achieved	10 [7]	0.19
Fe ₂ O ₃	rats peroral	310 [11]	98.6 g/kg [13]	6 [7]	0.005

Thus, the algorithm for rapid regulation of nanoparticle and nanoaerosol concentrations in workroom air is as follows:

1. Estimate the comparative toxicities of nanoparticles and microparticles.
2. Select safety margin allowing for available comparative experimental data on the toxicity of nanoparticles and microparticles.
3. Calculate predicted workroom MACs for nanoparticles using the standard formula and allowing for the safety margin.

The proposed approach to calculating tentative hygienic standards for nanoparticle aerosols in workroom air enable NP hazard indices to be evaluated and occupational health risks in the nano-industry to be assessed preemptively.

REFERENCES

1. Su C. Environmental implications and applications of engineered nanoscale magnetite and its hybrid nanocomposites: A review of recent literature / C. Su http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Su%20C%5Bauthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27477792 // J. Hazard Mater. – 2016.
2. Morimoto Y. Evaluation of Pulmonary Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles Following Inhalation and Intratracheal Instillation / Y. Morimoto, H. Izumi et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17(1241). – P. 1-16.
3. Theodorou I.G. Effect of pulmonary surfactant on the dissolution, stability and uptake of zinc oxide nanowires by human respiratory epithelial cells. / I.G. Theodorou, P. Ruenraroengsak et al. // Nanotoxicology. – 2016. – Vol. 21. – P.1-37.
4. Minetto D. Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C60 engineered nanoparticles: An overview / D. Minetto, A. Volpi Ghirardini, G. Libralato // Environ. Int. – 2016. – Vol. 92-93. – P. 189-201.
5. Metodicheskie ukazaniya po ustanovleniyu orientirovochnykh bezopasnykh urovnei vozdeistviya vrednykh veshchestv v vozdukh rabochei zony: MU 4000-85. – M., 1985.
6. Problemy promyshlennoi toksikologii: Sbornik / Pod red. F. Kaloyanovoi Simeonovoi, I.V. Sanotskogo: Postoyan. komis. po sotrudnichestvu v oblasti zdravookhraneniya. – M.: SEHV 1982. – 92 s.
7. Predel'no dopustimye koncentracii (PDK) vrednykh veshchestv v vozdukh rabochei zony: GN 2.2.5.1313-03.
8. Tao W. Influence of silver nanoparticles on heavy metals of pore water in contaminated river sediments / W. Tao, G. Chen et al. // Chemosphere. – 2016. – Vol. 162. – P. 117-124.
9. Lee I.C. Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats / I.C. Lee, J.W. Ko et al. // Int. J. Nanomedicine. – 2016. – Vol. 11. – P. 2883-2900.
10. Li M. Arsenate accumulation, distribution, and toxicity associated with titanium dioxide nanoparticles in *Daphnia magna* / M. Li, Z. Luo et al. // Environ. Sci. Technol. – 2016. – Abstract.
11. Sadeghi L. Toxic effects of the Fe₂O₃ nanoparticles on the liver and lung tissue / L. Sadeghi, V. Babadi et al. // Bratisl. Lek. Listy. – 2015. – Vol. 116(6). – P. 373-378.
12. Han X. Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in *Drosophila* and their microbiomes / X. Han, B. Geller et al. // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 487. – P. 822-829.
13. Hinderliter P.M. A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. / P.M. Hinderliter, K.R. Minard et al. // Part Fibre Toxicol. – 2010. – Vol. 30, 7(1). – P. 36.

AN IN VITRO STUDY OF EMBRYOGENIC, CYTOGENIC AND CARCINOGENIC PROPERTIES OF SiO₂ NANOPARTICLES

Shabasheva L. V., Protasova G. A., Panferova Y. A., Popov V. B.

*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of Russia's
Federal Medical-Biological Agency,
Saint-Petersburg, Russia
E-mail: shabash69@gmail.com*

A set of rapid tests was developed to assess nanoparticle (NP) cytotoxicity, genotoxicity, embryotoxicity and carcinogenicity. It involves using simultaneously three models: pre- and post-implantation mouse embryo cultures (cleavage and blastocyst formation stages, days 1-5), those of rats (head process formation – 30 somite pairs, day 9.5-11.5), and human peripheral blood lymphocyte (HPBL) culture. The aim of the study was to assess embryogenic, cytogenic and carcinogenic properties of SiO₂ nanoparticles in vitro.

SiO₂ nanoparticles with 12 nm particle size (Sigma-Aldrich) were used in the study. To prevent agglomeration, the suspension was pretreated by ultrasound, and then bovine serum albumin at a final concentration of 15.0 µg/mL was added to the NP suspension. The NPs were introduced into the culture medium at 20, 100 and 200 µg/mL concentrations. In order to evaluate NP potential embryotoxicity, starting from 2-cell stage blastomeres, the cleaving mouse embryos were grown in drop cultures under a layer of liquid paraffin oil (20 embryos per drop) with different NP concentrations added to the medium. The cultures were grown in a multi gas incubator (O₂/N₂/CO₂) for 72 hours. The post-implantation rat embryo cultures were grown in a CO₂ incubator for 48 hours from 2-4 to 30-somite pairs, with the suspended SiO₂ NPs added at 20-200 µg/mL concentrations [1]. Gene expression analysis related to neural tube formation and defects was carried out using SYBRGreen I RT2-qPCR Primer Assay (Sabioscience, Qiagen) with the 18S rRNA used for RNA normalisation. The following genes related to neural tube formation in rat embryos at the initial organogenic stages were selected: bone morphogenetic proteins 2 and 4 (BMP2 and BMP4), sonic hedgehog (Shh), tubby-like protein 3 (Tulp3, a negative regulator of Shh signaling), neurogenin-1 (neurog1). Abnormalities in these genes cause morphogenetic defects in craniofacial region. NP cytotoxic and genotoxic effects were studied in human peripheral blood lymphocyte culture (72 hours) after blocking cytokinesis with cytochalasin-B [2]. In this study, an alternative carcinogenesis assessment model was tested using HPBL culture. This approach was based on detecting possible malignant transformations in the lymphocyte interphase nucleus preparations using Fluorescence in situ hybridization (FISH) assay with a probe targeting chromosome 20q13 locus (AURKA gene) after exposure to the known carcinogen NiCl₂ (positive control, 50 µg/mL) and SiO₂ NPs (200 µg/mL). AURKA gene is involved in coding Aurora kinase A that is essential for regular mitotic chromosomal segregation. AURKA gene amplification and/or

overexpression was observed in the cells of various malignant tumors (colorectal cancer, bladder cancer, brain tumor, breast cancer, ovarian cancer, etc.). FISH assay with a probe targeting chromosome 20q13 locus (AURKA gene) was used to analyze: 1) AURKA gene frequency; 2) synchronous replication of homologous loci (becomes asynchronous in cases of genetic imbalance including cancer cells); 3) apoptosis [3, 4, 5].

The results were statistically processed based on multiple comparisons of mean values using Bartlett's test, having analyzed the homogeneity of the sample variances. For homogeneity testing, one-way analysis of variance (ANOVA) was used with subsequent correction of the differences between the control group and the experimental groups using the Bonferroni t-test and the Dunnett q-test. When there was no homogeneity of variances the nonparametric Kruskal-Wallis test was used corrected by the Dunn test to compare mean values of the groups [6]. The difference was considered significant if $p < 0.05$. The data were processed using Prism 5 software (GraphPad, USA)

Introducing SiO₂ NPs into the pre-implantation embryo cultures at 100 and 200 µg/mL concentrations caused death of individual embryos by inducing cleavage rate deceleration that resulted in statistically significant reduction of total cell mass ($P < 0.01$, $P < 0.001$) and the number of hatching blastocysts (1.4 – 1.3 times decrease compared to the control group, $P \geq 0.05$). SiO₂ NPs did not affect the development of pre-implantation embryos at 20 µg/mL concentrations. The embryolethal effect was not observed at the initial organogenic stages in SiO₂ NP-containing medium at the same concentrations, but the concentrations of 100 and 200 µg/mL caused a number of structural and dynamic abnormalities. Additionally, decelerated embryo morphogenesis (decelerated somitogenesis, reduced craniocaudal size) was observed. Gene expression analysis showed that after introducing SiO₂ NPs into the cultures at 100 and 200 µg/mL concentrations Neurogenin1 gene expression occurred at the level of transcription (6.77 and 5.1 times respectively). There were no significant changes in the level of expression of the other genes associated with neuronal differentiation and neural tube formation. Neurogenin 1 activation may be related to neural tube development abnormalities, but this requires further investigation.

SiO₂ NPs concentrations of 100 and 200 µg/mL did not induce cytotoxic or genotoxic effects in HPBL culture (cell proliferative activity, pyknosis and apoptosis frequency, as well as the number of micronuclei were not different from those in the control group).

Potential SiO₂ NP carcinogenicity revealed increased number of cells with AURKA overexpression, elevated number of damaged and apoptotic cells, and asynchronized AURKA replication. Exposure to SiO₂ NPs lead to increased number of cells marked with a single FISH probe compared to the norm and positive control. There was no statistical difference between the results of 200 µg/mL SiO₂ exposure and that of 50 µg/mL NiCl₂, apart from elevated number of nuclei marked with marked with a single FISH probe in the NP experiments. The results obtained confirm the numerous reports of NiCl₂ carcinogenicity. The results of SiO₂ NP assessment indicate their possible carcinogenicity.

REFERENCES

1. Popov V. In vitro embryotoxicity testing / V. Popov, G. Protasova // Reproductive and Developmental Toxicology. – 2011. – P. 147-157.
2. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay / M. Fenech // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2, №5. – P. 1084-1104.
3. Yang F., Guo X., Yang G. AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma / F. Yang, X. Guo, G. Yang // Modern Pathology. – 2011. – Vol. 24. – P. 836-845.
4. Asynchronous replication of homologous DNA alpha-satellite loci in man is associated with nondisjunction / T. Litmanovitch, M.M. Altaras, A. Dotan, L. Avivi // Cytogenetics and cell genetics. – 1998. – Vol. 81. – P. 26-35.
5. Mendoza A. Silica nanoparticles induce oxidative stress and inflammation of human peripheral blood mononuclear cells / A. Mendoza, J.A. Torres-Hemendez, G.G. Ault // Cell Stress Shaperones. – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 777-790.
6. Glantz S.A. Primer of Biostatistics / S.A. Glantz. – NY-Toronto, 1992. – 440 p.

UDC 613.2: 615.015.3: 615.9

PROTEOMIC AND METABOLOMIC MARKERS OF NANOTOXICITY: STATE OF THE ART REVIEW

Shipelin V. A., Gmoshinsky I. V., Shumakova A. A., Khotimchenko S. A.

*Federal state budgetary scientific institution
«Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology»,
Moscow, Russia
E-mail: v.shipelin@yandex.ru*

Today, studies of individual biomarkers reflecting the development of immune and inflammatory responses to nanoparticles (NP) are paralleled by increasing productive use of the so-called «omics» technologies, first of all proteomics and metabolomics, for assessing the toxic effect of NPs. These advanced experimental approaches enable researchers to study the metabolic processes taking place in cells, offering the possibilities of simultaneous identification and quantitative estimation of hundreds and thousands of types of macromolecules (proteins) in a biological sample and bioinformatic analysis of the significance of multiple changes in them (so-called «big data») for a pathological process studied.

The important role of proteomic and metabolomic toxicity markers has been established in a number of studies devoted to toxicological hygienic assessment of carbon nanotubes (CNT). CNT toxicity is an important issue in nanotoxicology. In the 2000s, the publications considered predominantly lipid peroxidation products and enzymatic markers of damage to cells of various types as CNT toxic effect biomarkers. Subsequently it was shown that the toxic action of CNT on the organism was based on immunopathological mechanisms, and, hence, the early warning and highly sensitive markers of such action could be the expression and levels of various proinflammatory cytokines and chemokines. One of the first publications on this issue described a finding

that the incubation of epidermal keratinocytes with multilayered CNT (MCNT) was accompanied by the production of proinflammatory IL-8 by the cells [1]. According to the data, single-layer CNT instilled intratracheally to or inhaled by rats caused expression of the mRNA of various proinflammatory cytokines, being thus more active than soot or gold NPs and quantum dots and fullerenes [2].

Observations in the context of a real facility manufacturing MCNT showed that the sputum of the workers exposed to the aerosols of this nanomaterial contained increased levels of such markers of inflammation and fibrosis as IL-1 β , IL-6, TNF- α , and KL-6 [3, 4]. The most sensitive marker of exposure to MCNT in the blood serum was chemokine TGF- β . Similar results were obtained in a study of inhalation toxicity biomarkers in an experiment on C57Bl/6 mice. According to these authors, their data point to the importance of monitoring occupational exposure to MCNT using the above biomarkers as evidence of this process. Another study characterized the role of a group of biomarkers associated with the mechanism of inflammatory reaction mediated by the inflammatory cascade of the NLRP3 inflammasome [5].

An intratracheal instillation of native or carboxylated MCNT to C57Bl/6 mice was found to raise the IL-1 β , IL-18 and IL-33 levels and the activity of cathepsin B, lactate dehydrogenase and the general albumin content of the bronchoalveolar lavage fluid. A close interrelation was found between the toxicity of various kinds of MCNT and activation of NLRP3 in pulmonary tissue. It is obvious that any proper choice of metabolomic biomarkers should be preceded by an analysis of a considerable amount of data to ensure that a correct vector of further research is identified in nanotoxicology. To date, we have carried out a 100-day subacute experiment with peroral administration of MCNT to study a broad range of metabolomic indices. The results of this study will be published next year.

We will now consider the potentialities of proteomic biomarkers using as an example our works on proteomic profiling of a microsomal liver fraction by 2D-electrophoresis and tandem mass spectrometry. In a 92-day experiment set up to carry out a toxicological hygienic assessment of «Argovit®» nanosize colloidal silver in a dose of 0.1, 1 and 10 mg/kg of body mass by 2D-electrophoresis, we analysed 30 samples of rat liver microsomes from five groups, 6 gels in each group. The silver NPs were found to produce a significant impact on the proteome of the rat liver microsomal fraction, which manifested itself not only in the disappearance but also appearance of a number of protein spots. The majority of the identified variable proteins were low-copy ones with a very low optical density of the spots, which made it problematic to identify them by mass spectrometry. As a result of the analysis, we selected a number of high-copy proteins in the microsomal fraction as potential candidates for being biological markers of silver NP effects. The value of these proteins as nanotoxicity markers will be established after the identification and establishment of their function by tandem mass spectrometry.

Similarly, in an experiment involving peroral administration of silica during 28 days in a concentration of 1, 10, 100 mg/kg of body mass, the identification of proteins expressed under the impact of NPs in hepatocytic microsomes by mass spectrometry revealed a number of proteins which are present in the database. However, the biological function was established only for one dominant protein peak

disappearing in liver microsomes under the impact of the highest of the NP doses. The resulting peptide spectrum corresponded to a protein with a molecular mass of 78 kDa – GRP78 (glucose-regulated protein precursor) belonging to the family of 70 kDa heat shock proteins, known as chaperone and localized in the endoplasmic reticulum on the surface of cells, including hepatocytes. Protein peak identification was also carried out in an experiment involving aluminium oxide NPs in which NPs in a dose of 1 and 100 mg/kg of body mass were administered perorally to animals during 28 days. In all groups of animals, exposure to aluminium oxide NPs caused, irrespective of the doses used, 11 new protein spots to appear and 15 protein spots to disappear in the electrophoretogram compared with the control animals. Mass spectral analysis revealed among the proteins expressed under the impact of NPs in animal liver microsomes a number of polypeptide forms which are present in the international database. One of the dominant peaks was identified as a proteasome α type-3 of the proteasome endopeptidase complex while the other as the autophagy factor 4B (ATG4B).

In another work of ours rats were administered perorally titanium dioxide NPs (anatase form) during 28 days in a concentration of 0.1 to 10.0 mg/kg of body mass/day. As a result, we found an expression of rat liver microsome proteins, which was especially marked at higher concentrations. Mass spectrometric identification of the proteins revealed a dominant peak expressed under the impact of NPs in liver microsomes at a dose of 0.1 mg/kg of body mass and higher, which was identified as glutathione-S-transferase Mu 2. The molecular mass of this protein was 41.55 kDa, and the isoelectric point pI = 8.0.

In summary, recently the potentialities of proteomic studies in nanotoxicology have been considerably enhanced thanks to the introduction of biocomputer science methods for data interpretation. The use of 2D-electrophoresis with tandem mass spectrometry is, therefore, an important promising tool for the purposes of nanotoxicology. Moreover, the identification of expressed functionally significant proteins should be a compulsory component of studies and should enable the mechanisms of damaging action of NPs to be eventually understood and potential «targets» for NPs entering the organism to be identified.

REFERENCES

1. Monteiro-Riviere N.A. Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin / N.A. Monteiro-Riviere, A.O. Inman // *Carbon*. – 2006. – № 44. – P. 1070-1078.
2. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice / N.R. Jacobsen, P. Møller, K.A. Jensen, U. Vogel // *Part. Fibre Toxicol.* – 2009. – Vol. 6, № 2. – P. 1-17.
3. Biologicheskie ehffekty mnogoslainykh uglerodnykh nanotrubok pri legochnoi ekspozitsii in vivo / T.O. Khaliullin, E.R. Kisin, R.R. Zalyalov, A.A. Shvedova i dr. // *Toksikologicheskij vestnik*. – 2013. – № 4. – S. 17-21.
4. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs / L.M. Fatkhutdinova, T.O. Khaliullin, O.L. Vasil'yeva, R.R. Zalyalov et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 2016. – Vol.15. –№ 299. – P.125-131.

5. Effect of multi-walled carbon nanotube surface modification on bioactivity in the C57BL/6 mouse model / T.M. Sager, M.W. Wolfarth, M. Andrew, A. Hubbs et al. // *Nanotoxicology*. – 2014. – Vol.8(3). – P. 317-327.

UDC 537.9

**THE CONTRIBUTION OF THE URAL CENTRE FOR SHARED USE
«MODERN NANOTECHNOLOGY» TO EXPERIMENTAL
TOXICOLOGICAL STUDIES
OF METAL OXIDE NANOPARTICLES**

**Shur V. Y.¹, Tyurnina A. E.^{1,2}, Kuznetsov D. K.¹, Shishkina E. V.¹,
Vasileva D. S.¹, Vazhenin V. A.¹, Potapov A. P.¹, Morozova M. V.¹,
Zubarev I. V.¹, Pryakhina V. I.¹**

¹*Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University,
Ekaterinburg, Russia*

²*Ural Research Institute of Metrology,
Ekaterinburg, Russia*

E-mail: vladimir.shur@urfu.ru

The study of nanoparticle toxicity (nanotoxicology) requires production of stable high concentration colloids of with pure model nanoparticles of given composition, sizes and shapes. Laser ablation in water provides the unique ability to produce colloids of pure metals and metal oxides with required parameters. The colloids of Au, Ag, CuO, NiO, PbO, ZnO, Fe₂O₃, and Mn₃O₄ nanoparticles with narrow distribution function and concentration up to 0.5 g/l with high enough stability have been produced to study the impact of the nanoparticles on biological tissues and cells.

Pulsed Yb fiber laser (1064 nm, 100 ns, 21 kHz) has been used for ablation of pure metal target in deionized water and subsequent fragmentation of the suspension. The NPs were synthesized in several stages: surface treatment by focused laser beam scanning, ablation of the target, additional fragmentation, drying to increase the concentration of the solution up to 0.5 g/l and heating to make the NPs self-organize and reshape. The optimized technology allowed producing the required colloids stable for more than 30 days containing spherical NPs with average sizes from 10 to 60 nm. The size distribution function has been measured by Zetasizer Nano ZS particle size analyzer and by statistical analysis of the images obtained by Auriga CrossBeam scanning electron microscope. The composition has been analyzed by Alpha 300 AR WiTec confocal Raman microscope.

The total content of metals in the samples of liver, kidneys, spleen, and brain of the rats exposed to the NPs was obtained by atomic emission spectroscopy method using iCAP 6500 Duo atomic emission spectrometer with inductively coupled plasma. Samples of freeze-dried homogenized tissue were subjected to acid ignition using MARS 5 microwave accelerated reaction system. The content of paramagnetic

metal NPs was determined by electron paramagnetic resonance (EPR) method using EMX Plus Bruker electron paramagnetic resonance spectrometer.

The effect of the nanoparticles on alveolar macrophages was studied *in vivo* by atomic force and transmission electron microscopy. NP phagocytosis was found to induce nanoscale change in the cell surface morphology. The sizes of surface pits revealed by atomic force microscopy in the cells of rats exposed to the NPs are close to the NP sizes. Such pits were absent on the surface of the reference cells. The positions of the NPs in the rat tissue samples and the damage induced have been revealed by scanning transmission electron microscopy.

UDC 398.14

METHODOLOGICAL APPROACHES TO QUANTITATIVE MEASUREMENT OF NANOSCALE AEROSOL IN THE AIR

Slyshkina T. V., Gurvich V. B., Rosly O. F., Martin S. V., Galasheva O. E.

FBRI «Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection of Industrial Workers» of Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russia

E-mail: slishkina@ymrc.ru

The issue of quantitative measurement of occupational and atmospheric nanoscale aerosol with particle sizes of less than 100 nm is of immediate interest because the aerosol present in the air contains ultra microparticles, microparticles and macroparticles as well. Scientists from Russia and other countries suggest various ways to solve the problem of nanoscale aerosol sampling for further investigation.

Having reviewed the relevant literature and conducted laboratory experiments we have chosen the best and most efficient way to separate the nanofraction from total amount of aerosol during sample preparation for qualitative chemical analysis of the aerosol including both organic and nonorganic compounds. The technique involves sampling concentrated aerosol onto liquid medium resulting in stabilized suspension, measuring the dispersed particles in SALD-2300 Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Shimadzu), removing particles of 100 nm or larger by vacuum filtration using track-etched nonfibrous membrane filters, and further analyzing the filtrate: qualitative chemical analysis of the fraction with 100 nm or smaller-sized particles including both organic and nonorganic compounds. An algorithm of airborne nanoscale aerosol qualitative analysis was developed: sampling, preparing the samples, qualitative measurement of 17 metals (Al, Fe, Ca, Cd, Co, Si, Mg, Mn, Cu, Mo, Ni, Sn, Pb, Ti, Cr, Zn, Zr) using high-performance liquid chromatography, more specifically, polynuclear aromatic hydrocarbon electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry. The technique was tested in the operational areas where pyrometallurgical processing takes place (e.g. metal smelting and founding) at a number of industrial facilities in the Ural region.

THE RELATIVE CONTRIBUTION OF PHYSIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL MECHANISMS TO CONTROLLING PULMONARY TOXICOKINETICS OF METAL NANOPARTICLES DEPOSITED UNDER CHRONIC INHALATION EXPOSURE TO Fe₂O₃

**Sutunkova M. P.¹, Privalova L. I.¹, Katsnelson B. A.¹, Gurvich V. B.¹,
Minigalieva I. A.¹, Solovyeva S. N.¹, Shishkina E. V.², Zubarev I. V.²**

¹*The Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor, Ekaterinburg, Russia*

²*Ural Center for Shared Use «Modern nanotechnologies», Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia E-mail: marinasutunkova@yandex.ru*

Airborne Fe₂O₃ NPs with the mean diameter of 14±4nm produced by sparking from 99.99% pure iron rods were fed into a nose-only exposure tower. Rats were exposed to these NPs for 4 h a day, 5 days a week during up to 10 months at the mean concentration of 1.14±0.01mg/m³. We found a very low pulmonary accumulation of Fe₂O₃, gradually increasing with time. Judging by virtually normal histological picture of lungs and lung-associated lymph nodes and by the low hydroxyproline content of lungs, the pneumoconiotic process intensity was insignificant. Functional and biochemical indices for the organism status very mostly normal but some of them made consider the tested Fe₂O₃ NP level as a threshold one for development of a chronic systemic intoxication. In accordance with general principles of the maximum allowable concentration (MAC) in the workplace air setting, we believe justified a proposal to establish the MAC for Fe₂O₃ NPs at the level of 0.4 mg/m³.

EVALUATING RISKS OF REAL LIFE EXPOSURES

Tsatsakis A. M.

*Department of Toxicology & Forensic Science, Medical School, University of Crete,
Heraklion, Greece*

E-mail: tsatsaka@uoc.gr

The general population experiences uncontrolled multi-chemicals exposure from many different sources at doses around or well below regulatory limits. Therefore, traditional chronic toxicity evaluations for a single chemical could possibly miss to identify adequately all the risks. For this an experimental methodology that has the ambition to provide at one strike multi-answers to multi-questions is hereby proposed: a long-term toxicity study of non-commercial chemical mixtures, consisting of common everyday life chemicals (pesticides, food additives, life-style products components) at low and realistic dose levels around the regulatory

limits and with the simultaneous investigation of several key endpoints, like genotoxicity, endocrine disruption, target organ toxicity including the heart and systemic mechanistic pathways, like oxidative stress. In real life, the consumer is exposed to complex mixtures of chemicals via food and water consumption and via commercial products. Risk assessments, in general, however, focus on individual compounds. Therefore, the current regulatory approach does not assess overall risk in a highly relevant manner. This study will evaluate the cumulative toxicity of mixtures of different classes of pesticides alone and mixtures of different classes of pesticides together with food additives and common consumer product chemicals in more realistic doses after long term exposure. If the hypothesis of an increased risk or even a new hazard not currently identified from cumulative exposure to multiple chemicals were shown to be true, this will provide further information to public authorities and research communities supporting the effort to replace today's single-compound risk assessment with a more robust cumulative risk assessment paradigm.

UDC 616.1:532.602

NANOMATERIAL-INDUCED PULMONARY ACUTE PHASE RESPONSE CONSTITUTES A CAUSAL LINK BETWEEN INHALATION OF NANOMATERIALS AND RISK OF CARDIOVASCULAR DISEASE

**Vogel U.¹, Saber A. T.¹, Jacobsen N. R.¹, Poulsen S. S.¹, Yauk C.²,
Halappanavar S.², Wallin H.¹**

¹*National Research Centre for the Working Environment,
Copenhagen, Denmark*

²*Environmental Health Science and Research Bureau,
Health Canada*

E-mail: UBV@arbejdsmiljoforskning.dk

Inhalation of particles is associated with increased risk of cardiovascular disease in epidemiological studies. Inhalation of nanomaterials induces pulmonary inflammation that is proportional to the total surface area of the inhaled and deposited nanomaterials. Global transcription profiling in mouse lung tissue following of inhalation of TiO₂ nanoparticles on 11 consecutive days showed that the most differentially regulated gene was acute phase protein Serum Amyloid A3, *Saa3* [1]. The acute phase response is a systemic alarm response [2], and the blood levels of acute phase proteins CRP and SAA are associated with risk of cardiovascular disease in prospective studies [3].

We have recently shown that pulmonary exposure to nanomaterials including carbon black, titanium dioxide particles, carbon nanotubes and diesel exhaust particles [4] induces a time- and dose-dependent acute phase response both in terms of the number of differentially expressed acute phase response genes and the fold increase of *Saa3*, the most differentially expressed acute phase response gene [5]. Induction of pulmonary acute phase response has also been demonstrated at the

protein level. For example, SAA3 protein levels measured by Western blotting were increased 2.2 fold in lung tissue 5 days after inhalation exposure to nano-TiO₂ [1], and SAA levels were also elevated in bronchoalveolar fluid and plasma after intratracheal instillation of multi-walled carbon nanotubes [6]. Plasma levels of SAA3 also correlated with pulmonary *Saa3* mRNA levels following pulmonary exposure to carbon nanotubes [7].

Pulmonary acute phase response measured as *Saa3* mRNA levels correlates closely with neutrophil influx [6] and the total surface area of deposited nanomaterials [5]. This implies that inhalation of nanosized particles would induce a much stronger acute phase response compared to the same mass of larger particles and that the accompanying risk of cardiovascular disease should be proportional to the increase in total surface area. This is especially relevant in relation to the consideration of nanoparticle-specific occupational exposure levels, and underscores the importance of occupational exposure for cardiovascular disease.

REFERENCE

1. S.Halappanavar, P.Jackson, A.Williams, K.A.Jensen, K.S.Hougaard, U.Vogel, C.L.Yauk, H.Wallin. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: A toxicogenomic study, *Environ Mol Mutagen* 52 (2011) 425-439.
2. C.Gabay, I.Kushner. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *New England Journal of Medicine* 340 (1999) 448-454.
3. P.M.Ridker, C.H.Hennekens, J.E.Buring, N.Rifai. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women, *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 836-843.
4. Z.O.Kyjovska, N.R.Jacobsen, A.T.Saber, S.Bengtson, P.Jackson, H.Wallin, U.Vogel. DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice, *Mutagenesis* (2015).
5. A.T.Saber, N.R.Jacobsen, P.Jackson, S.S.Poulsen, Z.O.Kyjovska, S.Halappanavar, C.L.Yauk, H.Wallin, U.Vogel. Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease, *Wiley. Interdiscip. Rev.Nanomed. Nanobiotechnol.* 6 (2014) 517-531.
6. A.T.Saber, J.S.Lamson, N.R.Jacobsen, G.Ravn-Haren, K.S.Hougaard, A.N.Nyendi, P.Wahlberg, A.M.Madsen, P.Jackson, H.Wallin, U.Vogel. Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk, *PLoS. One.* 8 (2013) e69020.
7. S.S.Poulsen, A.T.Saber, A.Mortensen, J.Szarek, D.Wu, A.Williams, O.Andersen, N.R.Jacobsen, C.L.Yauk, H.Wallin, S.Halappanavar, U.Vogel. Changes in cholesterol homeostasis and acute phase response link pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes to risk of cardiovascular disease, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 283 (2015) 210-222.

INHALATION TOXICITY ASSESSMENT OF MULTIWALLED CARBON NANOTUBES IN RATS BASED ON THE ACUTE AND CHRONIC EXPERIMENT RESULTS

**Vorob'ev A. V., Sigaev V. I., Tolchinskiy A. D., Uspenskaya S. N.,
Ivanova Yu. V., Zvyagina E. V., Rybalkin S. P., Mikhina L. V., Besaeva S. G.,
Mazanov A. A., Dyadishchev N. R.**

*Research Centre for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopharmaceuticals – a branch of
FSBI «The Institute of Immunology» of Russia's Federal Medical-Biological Agency
Serpukhov, Russia
E-mail: vsigaev@list.ru*

According to expert estimates, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) account for 98 percent of all carbon nanotubes (CNTs) synthesized in Russia [1]. Therefore studying toxic properties of MWCNTs is essential when carrying out research on sanitary and hygienic standardization (regulation limitation) as well as manufacturing and using them.

Over the past few years, there have been plenty of studies of the toxic properties of MWCNTs used in inhalation exposure of experimental animals (mice, rats).

A number of animal studies report the results of the 24-hour or several-day exposure to different atmospheric concentrations of MWCNTs. Stapleton P.A. et al. (2012) report pulmonary inflammation and cytotoxicity after single inhalation exposure of rats to 5 mg/m³ of MWCNTs followed by a 4-day observation [2]. Exposure to MWCNTs lead to significant increase in polymorphonuclear neutrophil (PMN), lactate dehydrogenase (LDH) activity and total protein content found in bronchoalveolar lavage fluid. Ryman-Rasmussen et al. (2009) found that mice developed airway fibrosis 14 days after single 6-hour inhalation exposure to 100 mg/m³ of MWCNTs [3].

Only few papers on MWCNT toxicity after long-term inhalation exposure in laboratory animals (rats) can be found in literature. So Ma-Hock L. et al. (2009) report study results of inhalation exposure to MWCNT concentrations of 0.1, 0.5, or 2.5 mg/m³ for 3 months in rats [4]. In a 13-week inhalation study carried out by Pauluhn J. (2010) rats were nose-only exposed to MWCNT concentrations of 0.1, 0.4, 1.5, and 6 mg/m³ for 13 consecutive weeks to. The author reported elevated levels of PMNs and soluble collagen in bronchoalveolar lavage fluid, as well as increased total protein content and lactate dehydrogenase (LDH) activity at MWCNT aerosol concentrations of 0.4 mg/m³ and higher [5]. Granulomatous changes and bronchioloalveolar hyperplasia were observed at 6 mg/m³ MWCNT aerosol concentrations.

Inhalation toxicity study was carried out using Taunit-M multiwalled carbon nanotubes developed at NanoTechCentre, Ltd (Tambov, Russia) [6].

The laboratory animals (white outbred male rats) were head-nose exposed in an aerosol exposure chamber developed at the Research Centre for Toxicology and

Hygienic Regulation of Biopharmaceuticals (RCTHRB) (RF patent No 2552945) using dry aerosol generator based on the of milling and fluidized bed operating principles, the device being also developed at the RCTHRB. The equipment characteristics and operating methodology have been previously described [7, 8]. The Taunite-M aerosol mainly consists of 2-6 μm particles (approximately 80%), the mean particle diameter being 3.0 μm .

Acute inhalation toxicity of the Taunite-M MWCNTs was studied in rats after single 4-hour exposure at Taunite-M aerosol concentrations of 111, 39, 14 and 6 mg/m^3 . The experiment results showed that CL_{50} exceeded the maximum Taunite-M concentration of 111 mg/m^3 used in the study (5 toxicometric indices differ from the controls). The concentration of 39 mg/m^3 was substantiated as acute effect threshold (3 toxicometric indices differ from the controls). No observed effect concentration of the Taunite-M aerosol in acute experiment was found to be 14 mg/m^3 . With this concentration only decreased level of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid was observed 14 days after the inhalation exposure. All the other indices studied corresponded to those observed in the control rats.

Chronic inhalation study was conducted by exposing of rats to Taunite-M MWCNT aerosol 4 hours per day, 5 days per week for 4 months at aerosol concentrations of 25.5 and 1 mg/m^3 . Inhalation exposure of rats to Taunite-M MWCNT aerosol for 4 months at the concentrations of 25 mg/m^3 induced macular anthracosis in rats. Fibrotic changes were only observed in individual animals and they were rather insignificant.

The Taunite-M MWCNT aerosol concentration of 25 mg/m^3 was evaluated as lowest observed adverse effect level (12 toxicometric indices differed from the controls), and the concentration of 5 mg/m^3 was substantiated as chronic effect threshold (7 toxicometric indices differed from the controls). The concentration of 1 mg/m^3 also studied in the experiment is suggested to be used as no effect concentration since proven changes that were found at this aerosol concentration were irregular and did not differ significantly from the control values. To make no effect concentration more specific further experiments are required at lower Taunite-M MWCNT aerosol concentrations. The nanomaterial was not found to be immunotoxic, nor did it have sensitizing properties

REFERENCES

1. Krestinin A.V. Problemy i perspektivy razvitiya industrii uglerodnykh nanotrubok v Rossii / A.V. Krestinin // Nanomaterialy. – 2007. – Vol.2, №5-6. – P. 18-23.
2. Impairment of Coronary Arteriolar Endothelium-Dependent Dilation after Multi-Walled Carbon Nanotube Inhalation: A Time-Course Study / P.A. Stapleton, V.C. Minarchick, A.M. Cumpston, W. McKinney et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol.13. – P. 13781-13803.
3. Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes Potentiate Airway Fibrosis in Murine Allergic Asthma / J.P. Ryman-Rasmussen, E.W. Tewksbury, O.R. Moss, M.F. Cesta et al.// Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2009. – Vol.40. – P. 349-358.

4. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months / L. Ma-Hock, S. Treumann, V. Strauss, S. Brill // *Toxicol. Sci.* – 2009. – Vol.112. – P. 468-481.

5. Pauluhn J. Subchronic 13-Week Inhalation Exposure of Rats to Multiwalled Carbon Nanotubes: Toxic Effects Are Determined by Density of Agglomerate Structures, Not Fibrillar Structures / J. Pauluhn // *J. Toxicol. Sci.* – 2010. – Vol.113. – P. 226-242.

6. Tkachev A.G. Uglerodnyy nanomaterial «Taunit» – struktura, svoystva, proizvodstvo i primeneniye / A.G. Tkachev // *Perspektivnye materialy.* – 2007. – №3. – P. 5-9.

7. Razrabotka i ispytaniya ekspozitsionnoy aerazol'noy kamernoy ustanovki dlya normirovaniya vrednykh veshchestv v vozdukhie rabochey zony / A.D. Tolchinskiy, V.I. Sigaev, A.V. Vorob'ev, A.A. Mazhinskiy // *Prikladnaya toksikologiya.* – 2014. – №1. – P. 10-17.

8. Tekhnicheskie i metodologicheskie aspekty perevoda voloknistykh uglerodnykh materialov v aerazol'noe sostoyanie pri provedenii ingyalyatsionnykh toksikologicheskikh eksperimentov / V.I. Sigaev, A.D. Tolchinskiy, A.V. Vorob'ev, E.V. Zvyagina // *Prikladnaya toksikologiya.* – 2015. – №1. – P. 44-54.

UDC 579.6:577.1:57.084

LIPOSOMAL CATECHINS FOR COMBATING LIPOPOLYSACCHARIDES-ACTIVATED MOUSE MICROGLIAL CELLS

Wu X.-Yu., Hsieh M.-F.,

*Department of Biomedical Engineering, Chung Yuan Christian University,
Taoyuan, Taiwan
E-mail: mfhsieh@cycu.edu.tw*

Introduction. In patients suffering from Parkinson's disease, dopaminergic neurons in the substantia nigra of midbrain are primarily degenerated. In the normal brain, microglial cells, known as phagocytotic cells, are mainly in rest. The activation of microglia can lead to the secretion of pro-inflammatory cytokines in the diseased part of the brain. In the recent years, clinical reports have indicated that a chronic inflammatory process mediated by microglial cells contributes partly to the death of dopaminergic neuron. To alleviate this symptom, epigallocatechin-3-galate (EGCG), one of the polyphenol agents in green tea having anti-oxidative effects, has the potential to suppress the inflammatory factors such as nitric oxide and TNF- α in the lipopolysaccharide-activated microglial cells through the down-regulation of iNOS and TNF- α gene expression. As a result, it can effectively reduce the attack in neurons by microglial cells. However, EGCG has limitations due to its water soluble property and low oral bioavailability. Hence, the aim of this study is to develop a nano-sized liposome carrying EGCG.

Methods. Lipid mixture of egg phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), and cholesterol was dissolved in chloroform and dried in a rotatory evaporator to give a lipid membrane. The hydration of the lipid membrane along with EGCG gave the primary liposome solution. The solution was further filtered through a membrane having pore size of 200 nm to form a nano-scale liposome solution. The particle size was determined by dynamic light scattering method. EGCG was extracted from green tea leaves. The toxicity of free EGCG was first evaluated to determine the tolerable concentration of EGCG in mouse microglial cell line (BV-2 cells). Thereafter the cellular uptake of EGCG-liposome was observed under fluorescent microscope. The anti-inflammatory effect of EGCG-liposome in BV-2 cells was then investigated.

Results and discussion. The anti-oxidative effect of extracted EGCG was determined by the percent of radical species DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenged by EGCG in a period of incubation of 30 minutes. 0.25 mg/mL of EGCG can scavenge more than 80% of DPPH in 5 minutes. To find a tolerable concentration of EGCG, BV-2 cells were cultured with various concentrations of EGCG. It was found that 50 μ M of EGCG or higher can lead to cytotoxicity as determined by MTT assay. The average particle sizes of LPS (liposome containing PS) and LPS-VE (liposome containing PS and Vitamin E) after loading of EGCG were 132.9 and 142.9 nm, respectively. Analysis of cellular uptake using PKH-26 fluorescent dye found that the liposomes of PC were not taken by BV-2 cells in an incubation period of 2 hours. On the contrary, the liposomes (LPS and LPS-VE) were found in the cytoplasm. After pretreated with liposomes for 1 hour, BV-2 cells were exposed in 50 ng/mL of lipopolysaccharides. The reduction of TNF- α cytokine was found in the group of LPS and LPS-VE. Among these liposomes, LPS-VE loading with EGCG shows the lowest secretion of TNF- α cytokine.

Conclusion. The activation of microglial cells is accompanied by the degenerative Parkinson's disease. The present study fabricates anti-inflammatory liposome containing green tea extracted EGCG to alleviate the release of TNF- α cytokine. The particle sizes of the liposome were controlled by the filtration membrane in the range of 130-140 nm. The cellular uptake of the liposome in mouse microglial BV-2 cells indicated that phosphatidylserine was effective as compared to egg phosphatidylcholine. The incorporation of EGCG and Vitamin E in the liposome was more effective to reduce the inflammatory cytokine TNF- α in the cultured medium. The promise of the present study in the delay of progression of Parkinson's disease could be further validated in the animal experiments.

REFERENCES

1. Vanna Sanna, Gianfranco Pintus, Anna Maria Roggio, et al., Targeted Biocompatible Nanoparticles for the Delivery of (-)-Epigallocatechin 3-Gallate to Prostate Cancer Cells, *Journal of Medicinal Chemistry* 54:1321-1332 (2011).
2. Rui Li, Yuan-Gui Huang, Du Fang, et al., (-)-Epigallocatechin Gallate Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Protects Against Inflammation-Mediated Dopaminergic Neuronal Injury, *Journal of Neuroscience Research* 78:723-731 (2004).

NANO-BIO INTERACTIONS: THE STORY OF MULTIWALLED CARBON NANOTUBES

Yan B.

Shandong University,

Jinan, China

E-mail: drbingyan@yahoo.com

Multiwalled carbon nanotubes (MCNT) are widely used in various industrial sectors, biomedicine, and many consumer products. However, their potential toxicity is a major concern. MCNTs enter human cells, perturb cellular signaling pathways, affect various cell functions, and cause malfunctions in animals [1-5]. Because a large portion of atoms in MCNT are on the surface, chemistry modification on their surface may change their biological properties significantly. We modified MCNT's surface using nano-combinatorial chemistry library approach. Novel MCNTs were discovered to exhibit reduced toxicity or re-program cellular signaling machineries [6, 7]. Exploring large sets of bio-assay data with chemoinformatics and computational chemistry, quantitative nanostructure-activity relationship (QNAR) has been established and predictive models built to predict biocompatible MCNTs.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21137002 and 91543204), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB14030401).

REFERENCES

1. Mu, Q.X., Broughton, D.L., Yan, B. Endosomal leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake. *Nano Letters* 2009, 9(12), 4370-4375.
2. Mu, Q.X., Du, G.Q., Chen, T.S., Zhang, B., Yan, B. Suppression of Human Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling by Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* 2009, 3, (5), 1139-1144.
3. Mu, Q.X., Jiang, G.B., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chemical Reviews*. 2014; 114(15):7740-7781.
4. Zhang, Y., Bai, Y.H., Jia, J.B., Gao, N.N., Li, Y., Zhang, R.N., Jiang, G.B., Yan, B. Perturbation of Physiological Systems by Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 3762-3809.
5. Bai, Y.H., Zhang, Y., Zhang, J.P., Mu, Q.X., Zhang, W.D., Butch, E., Snyder, S., Yan, B. Repeated carbon nanotube administrations in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(9), 683-689.
6. Zhou, H., Mu, Q., Gao, N., Liu, A., Xing, Y., Gao, S., Zhang, Q., Qu, G., Chen, Y., Liu, G., Zhang, B., Yan, B. A Nano-Combinatorial Library Strategy for the Discovery of Nanotubes with Reduced Protein-Binding, Cytotoxicity, and Immune Response, *Nano Lett.* 2008, 8 (3), 859-865.
7. Wu, L., Zhang, Y., Zhang, C.K., Cui, X.H., Zhai, S.M., Liu, Y., Li, C.L., Zhu, H., Qu, G.B., Jiang, G.B., Yan, B. Tuning Cell Autophagy by Diversifying Carbon Nanotube's Surface Chemistry. *ACS Nano*. 2014 Mar 25;8(3):2087-99.

THE STUDY OF NANOPARTICLES AS COMPONENTS OF INDUSTRIAL AEROSOLS AND SUSPENDED PARTICULATE MATTER IN WORK ZONE AIR

Zaytseva N. V.¹, Ulanova T. S.^{1,2}, Zlobina A. V.¹, Volkova M. V.^{1,2}, Gileva M. I.¹

¹*Federal Scientific Center for Medical
and Preventive Health Risk Management Technologies of Rospotrebnadzor,
Perm, Russia*

²*Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russia*

E-mail: ulanova@fcrisk.ru

Studying industrial working conditions associated with high risk of exposure to nanoscale aerosols is an important focus area for Rospotrebnadzor due to expanded use of nanotechnology. Arc welding and cutting, pyrometallurgical processes, manufacturing and using paints and varnishes, nanocoating, gas-aerosol diesel exhaust have been established involve high health risks.

Scientists from the Nanomaterial and Fine Particle Analysis Laboratory (Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies) studied fine particle aerosols in work zone air at various industrial facilities to detect, identify and evaluate nanoparticle content [1, 2, 3]. The study objective was to compare mass concentration of suspended particulate matter and number concentration of nanoparticles in work zone air during various industrial processes.

Mass concentration of suspended particulate matter was determined as recommended in Methodology Guidelines 4.1.2468-09 [4]. The aerosol particles captured on analytical aerosol filters for measuring mass concentrations (AFA-VP) were studied using Tescan MIRA3 scanning electron microscope at the Research Resource Centre for Molecular and Cell Technologies of Saint-Petersburg State University. Work zone airborne nanoparticle sizes were determined using DAS 2702 diffusion aerosol spectrometer as recommended in GOST R 54597-2011/ISO/TR 27628:2007, paragraph 6.3.4. [5], GOST R 8.755 – 2011 [6]. The diffusion aerosol spectrometer is a tandem including diffusion batteries and a condensation particle counter. The device can measure total number concentration of 3–200 nm particles, particle distribution width and particle size distribution spectrum within 3 – 200 nm. In computational terms [6], the distribution spectrum is unimodal and makes it possible to determine the following parameters: particle number concentration within maximum concentration range (particles per cm³), particle size range with maximum concentration (nm). The measuring time of one set of values was 0.8 – 1.2 minutes. It took 10 – 50 minutes to examine one industrial process. The sets of values were analyzed to detect outliers using Grubbs' test as recommended in GOST R 8.736 [7]. In case of dynamic change in number concentration over time corresponding the change in industrial processes observed, concentration values were combined in several samples using Grubbs' test [7].

Since there is no health standard for evaluating nanoparticle number concentrations in work zone air, values (similar in study algorithm) for workplaces of administrative and engineering staff not involved in the industrial processes were used for reference.

The study included mining, rubber manufacturing and chemical industrial facilities visited in 2013, 2015 – 2016. The results of work zone air analysis in the mining facility revealed essentially different characteristics of suspended particles: for underground mining, comparatively high number and mass concentrations of 0.5 – 3 μm ore particles were observed, the particle number concentration being no different from controls; for open-pit mining during floatation, high number concentrations and low mass concentrations of suspended particles were observed; during granulating, maximum number concentration of nanoparticles exceeded controls by 19 – 26 times; during loading maximum number concentration of nanoparticles was 6 times higher than controls. The change in particle sizes corresponding to maximum number concentrations was marked by slight particle size dispersion in the control point, so an additional microscopic study may be necessary to draw accurate conclusions about the particle properties and sizes for processes characterization in mining industry.

The work zone air in the shops at the rubber manufacturing facility was found to contain 5 – 200 nm particles. The deviation of sizes corresponding to the size distribution maximums was 2 – 20 nm compared to the controls (30 – 35 nm). Statistically significant excessive workplace number concentration varied from 4 to 11.2 times.

The chemical facility conditions were characterized by a higher particle number concentration with the distribution maximum in the workplaces 10 683 particles per cm^3 . However, 3 out of 7 workplaces had lower number concentrations, which is consistent with high humidity in the workplaces of absorption operator, deposition operator, raw material preparation and semifinished and finished product release operator.

The number concentrations observed in the workplace air of oxidation operator were 3 times higher than controls (32 844 particles per cm^3), those of condensation operator were 4.5 times higher than controls (48 544 particles per cm^3), those of chemicals production operator were 5 times higher than controls (53 583 particles per cm^3). The particle size corresponding to the distribution maximum was higher than controls in the workplace air of flaking operator and chemicals production operator.

The study results show that the workplace air of chemicals production operator was characterized by higher values for particle number concentration and particle size. 0 – 5 nm particles predominated in the workplace air of condensation operator, which may be due to the running of the refrigeration equipment.

Thus, the results of the study may be used to assess working conditions and occupational risks for nanomaterial production processes, as well as industrial processes associated with particle release. Additionally, these results allow us to raise the issue of controlling nanoscale particle level in workplace air and developing occupational exposure standards to assess occupational health risks and treat occupational diseases.

REFERENCES

1. Ulanova T.S. Results obtained in evaluation of parameters characterizing nano particles in air of titanium production workplace / T.S. Ulanova, A.V. Zlobina, D.A. Shekurova // *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. – 2013. – №11. – P. 37-41.
2. Ulanova T.S. Determination of nanoscale particles in the air of working zone at the metallurgical production / T.S. Ulanova, M.V. Antipyeva, M.I. Zabirova, M.V. Volkova // *Analiz riska zdorov'yu*. – 2015. – № 1. – P. 77-80.
3. Ulanova T.S. Determination of micro and nanoparticles in the workplace area at the enterprises of mining industry / T.S. Ulanova, O.V. Gileva, M.V. Volkova // *Analiz riska zdorov'yu*. – 2015. – № 4. – P. 44-48.
4. Izmerenie massovykh kontsentratsiy pyli v vozdukh rabochey zony predpriyatiy gornorudnoy i nerudnoy promyshlennosti: MUK 4.1.2468-09. – M.: Federal'nyy tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2009.
5. Workplace atmospheres – Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosols – Inhalation exposure characterization and assessment: GOST R 54597-2011/ISO/TR 27628:2007. – M.: Standartinform, 2012.
6. State system for ensuring the uniformity of measurements. Disperse composition of gas atmospheres. Determination of nanoparticle size by diffusion spectral analysis: GOST R 8.755-2011. – M.: Standartinform, 2012.
7. State system for ensuring the uniformity of measurements. Multiple direct measurements. Methods of measurement results processing. Main principles: GOST R 8.736-2011. – M.: Standartinform, 2013.

UDC 544.773:546.57:57.044:613.2615.9

TOXICOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL HEALTH CHARACTERIZATION OF SOME METALLIC NANOPARTICLES DEPENDING ON THE EXPOSURE TYPE: BIOACCUMULATION AND MORPHOFUNCTIONAL OUTCOMES

Zaitseva N. V.^{1,2}, Zemlyanova M. A.¹, Zvezdin V. N.¹, Dovbysh A. A.¹

¹ *Federal Scientific Center for Medical
and Preventive Health Risk Management Technologies of Rospotrebnadzor,
Perm, Russia*

² *Perm State Medical University,
Perm, Russia
E-mail: zem@fcrisk.ru*

Active nanocluster formation both in Russia and abroad, growing the world's market segment of nanoproducts, expanded commercial applications in key industries (airspace, biotechnology, power industry, electronics and information technology, manufacturing industry and consumer goods sector [1]) necessitates comprehensive investigation of potential threats in human life and activities associated with large-scale expansion of nanotechnology and nanobiotechnology. Although these materials (including metal nanoparticles) have undeniably innovative characteristics, they may

be hazardous for human health and for environmental compartments at every stage of their production and use, and have grave social and economical consequences in the future due to their physicochemical properties [2]. In view of this, the number of studies carried out by a range of Russian research centres is rather significant [3-6]. Finding the link between the physical properties (such as size, form, surface structure, the degree of aggregation) of nanomaterials including metal nanoparticles (NPs) that induce toxic response in biological structures is of special importance [7-10]. The Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies has been developing this research area by refining and systematizing our understanding of the underinvestigated physical properties and toxic effects of inhalation and opal exposure to various common metal NPs.

The aim of the research was to assess bioaccumulation and morphofunctional outcomes of some metallic nanoparticles in terms of toxicology and environmental health.

Materials and methods. Manganese oxide (MnO) and nickel oxide (NiO) nanoscale particles associated with high potential health risk were studied experimentally. The predominant mean lateral sizes of the NPs suspended in water are 15 – 29 nm for MnO and 17 – 45 nm for NiO, which is respectively up to 1300 and 330 times smaller than their microscale analogues (measured using scanning electron microscopy). The concentrations of Mn and Ni NPs suspended in water were 41.37 ± 2.5 mg/mL and 50.0 ± 3.4 mg/mL (expressed as MnO and NiO respectively) (measured using the inductively coupled plasma mass spectrometry method, Agilent 7500cx mass spectrometer (Agilent Technologies Inc, USA)).

The functional and morphological changes were studied using MnO NPs suspended in water that laboratory animals (200 ± 10 g male and female Wistar rats, $n=100$, 4 exposed and 1 control group) were exposed intragastrically via gastric tube for 90 days, the median lethal dose (LD50) varying between 1/10 and 1/500 in accordance with GOST 32644-2014 and Methodological Guidelines 1.2.2520-09. Functional abnormalities were evaluated by measuring biochemical changes in the values of neuronal function (glutamate and γ -aminobutyric acid levels in blood serum), oxidative stress and antioxidative system balance (lipid and malondialdehyde (MDA) hydroperoxide levels, Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) levels, total antioxidant status (TAS) in blood serum). Morphological changes in tissues (brain, heart, lungs, spleen, liver, kidneys, stomach, pancreas, small and large intestines) were measured by 400-power microscopic examination of histological specimens following the procedure established for Thermo Scientific and Carl Zeiss (Germany) equipment.

Measuring and assessing bioaccumulation (nanomaterial accumulation in brain, kidney, liver, lung and blood tissues) as well as morphological changes in visceral organs (brain, heart, lungs, spleen, liver, kidneys, stomach, pancreas, small and large intestines) were conducted using NiO NPs suspended in water that 25 – 30 g white male and female BALB/C mice ($n=30$) were exposed via inhalation in accordance with GOST 32646-2014, Regional standard (OECD, Test No403:2008, IDT), Methodological Guidelines 1.2.2520-09. Inhalation intake modelling of the NPs compared to their microscale analogues was carried out using software-integrated inhalation exposure system with whole exposure chamber (TSE Systems GmbH, Germany).

The experiments and procedures were done as directed by guidelines and standards regulating ethical practices regarding animal experiments.

Results. Measuring and assessing balance levels of neurotransmitters as well as oxidative stress and antioxidative system showed functional abnormalities with dose-dependent effects for long-term exposure to MnO NPs. Statistically significant increase in serum lipid and (MDA) hydroperoxides was observed at the doses of 10.0 – 260.0 mg/kg on day 30 compared to the control group (1.4-1.9 and 1.6-2.0 times respectively, $p < 0.001$). Elevated serum lipid and MDA hydroperoxide levels persisted on day 90 of exposure, the multiplicity of baseline – control values difference being 1.3 – 1.9 times ($p < 0.001$). No statistically significant differences in baseline-control values were observed throughout the experiment. Antioxidant system assessment showed that long-term exposure of rats to 10.0-260.0 mg/kg doses caused statistically significant time-dependent decrease in serum Cu/ZnSOD and TAS levels. Throughout the experiment, Cu/ZnSOD levels were 1.4 – 4.6 times lower than baseline and control levels ($p < 0.001 - 0.002$), and TAS levels 1.6-5.4 times lower ($p < 0.001$). TAS level at 5 mg/kg dose in rats did not differ significantly from baseline or control level throughout the experiment.

The levels of main neurotransmitters were evaluated in the animals on day 90 of exposure. Serum glutamate levels were elevated and γ -aminobutyric acid levels were decreased compared to baseline and control levels, the change being dose-dependent. Glutamate levels increased 2 – 3.8 times depending on the dose ($p < 0.001$). Serum γ -aminobutyric acid levels were decreased 2.3 – 2.7 times ($p < 0.001$). The dose of 5.0 mg/kg did not decrease serum levels in rats compared to controls.

Structural changes in brain tissue were observed, they depended on the dose of MnO NPs suspended in water as well. The highest dose of 260 mg/kg body mass per 24 hours induced acute vascular congestion with red blood cell diapedesis and local hemorrhage; subarachnoid hemorrhage, brain swelling with pericellular and perivascular space expansion; focal nerve fiber demyelination in cerebral cortex and cerebellum. The dose of 50 mg/kg induced local pericellular and perivascular space expansion in cerebral cortex with cell differentiation intact, local subarachnoid hemorrhage and focal neuronal degeneration.

The dose of 10 mg/kg body mass per 24 hours was found to induce insignificant perivascular space expansion. Exposure to 5 mg/kg the morphological pattern of brain and cerebellum tissues corresponds to controls and does not change the pattern in the brain regions. More severe and extended pathomorphological changes in internal organ tissues were found after intragastric instillation of the 10 mg/kg MnO NP dose for 90 days.

Such exposure induced haemodynamic abnormalities in the circulatory system in the form of mild or moderate local vascular congestion and subarachnoid hemorrhage in the brain, liver, lungs, kidneys and heart; in the lymphatic system in the form of mild or moderate perivascular lymphomacrophage infiltrates in lung tissue affecting the adjacent alveoli; and in the macrophage system in the form of activated alveolar macrophages in small clusters in alveolar lumina compared to the changes induced by the microscale analogue in the form of local vascular congestion, subarachnoid hemorrhage in the brain, minor local lymphomacrophage infiltrates in

the lungs and the gastrointestinal tract. Expanded perivascular and pericellular spaces were observed in the brain, as well as mild perivascular tender fiber cardiosclerosis and local hepatocyte proteinosis that were not found after microscale analogue instillation.

The study of 4-hour inhalation exposure to aerosolized nanoscale NiO (at actual NiO concentration of 1.34 ± 0.07 mg/dm³ and absolute particle concentration of 140194 ± 27768 units/dm³) revealed 14 – 39-times higher penetrating power than that of its microscale counterpart ($p = 0.0001$).

Conclusion. The distinctive physical properties of nanoparticles including metal NPs (size, specific surface area, adsorption capacity, particle charge) potentially increase their tissue penetrating power, reactivity and toxicity. The study of bioaccumulation and morphofunctional changes in tissues after separate exposure to MnO and NiO NPs showed metal oxide NPs to have high penetrating power and low excretion capacity. The list of vital organs affected by the NP properties includes brain, liver, spleen, lungs. These properties account for dose-dependent morphofunctional abnormalities in critical cells and target organs. Higher degree of morphological changes in the circulatory, lymphatic and macrophage systems as well as liver, brain and heart tissue abnormalities not found under exposure to analogous microparticles confirm NP higher toxicity and the fact that the severity of pathological processes depends on the size of the particles.

We suggest that the experimental results obtained should be taken into account when developing monitoring and preventive programmes aimed at attenuating and eliminating the adverse health effects of metal nanomaterials and nano-enabled products.

REFERENCES

1. Rezul'taty analiza nanoindustrii v ramkakh TS i EEP (analiticheskiy material). – M., 2014. Access mode: <http://www.nanonewsnet.ru/news/2015/rezultaty-analiza-nanoindustrii-v-ramkakh-ts-eep> (Date of access: 15.08.2016).
2. Onishchenko G.G Security strategy in nanoindustry / G.G. Onishchenko // Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. – 2011. – № 5. – P. 4-8.
3. Safety of nanoparticles and nanomaterials for environmental and occupational space / A.I. Potapov, V.N. Rakitskiy, A.V. Tulakin et al. // Gigiena i sanitariya. – 2013. – № 3. – P. 8-14.
4. Comprehensive medical-biological evaluation of nanomaterials safety: communicatory-analytical and experimental constituents / V.A. Tutelyan, S.A. Khotimchenko, I.V. Gmshinski, A.A. Shumakova et al. // Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. – 2011. – № 5. – P.15-18.
5. Main results of toxicological experiments in vivo with some metal and metal oxides nanoparticles / B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, M.P. Sutunkova, V.B. Gurvich et al. // Toksikologicheskiy vestnik. – 2015. – № 3. – P. 26-38.
6. Acute inhalation toxicity of manganese oxide nanoparticles / Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Zvezdin V.N., Akafieva T.I., Saenko E.V. // Nanotechnologies in Russia. – 2015. – Vol.10. – № 5-6. – P. 468-474.

7. Lower airways response in rats to a single or combined intratracheal instillation of manganese and nickel nanoparticles and its attenuation with a bio-protective pre-treatment /B.A. Katsnelson, I.A. Minigalieva, L.I. Privalova, M.P. Sutunkova et al. // Toksikologicheskiy vestnik. – 2014. – № 6. – P. 8-14.

8. Toxicological evaluation of nanosized colloidal silver, stabilized with polyvinylpyrrolidone, in 92-day experiment on rats. II. Internal organs morphology / N.V. Zaytseva, M.A. Zemlyanova, V.N. Zvezdin, A.A. Dovbysh et al. // Вопросы питания. – 2016. – Vol. 85, № 1. – P. 47-55.

9. Biomarkers of inhalation influence nanosized aerosols / E.V. Zibarev, M.V. Chashchin, A.V. Kuzmin, S.M. Nikonova et al. // Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. – 2011. – № 5. – P. 21-23.

UDC 656.1:504.056:616-056

BASOPHIL MEDIATED CHRONIC ALLERGIC INFLAMMATION IN VEHICLE-EMITTED PARTICLES EXPOSURE

Zakharenko A. M.¹, Engin A. B.², Chernyshev V. V.¹, Chaika V. V.¹, Ugay S. M.¹, Nikiforov P. A.¹, Andreev V. V.¹, Drozd V. A.¹, Nikitina A. V.¹, Solomennik S. F.¹, Kudryavkina O. R.¹, Liu X.⁴, Yuan W.⁴, Tsatsakis A. M.^{1,3}, Golokhvast K. S.¹

¹ *Far Eastern Federal University, Engineering School,
Scientific Educational Centre of Nanotechnology,
Vladivostok, Russia*

² *Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology,
Ankara, Turkey*

³ *University of Crete, Medical School, Department of Toxicology and Forensic Sciences,
Rethymno, Greece*

⁴ *Biology Institute Shandong Academy of Science,
Jinan, China*

E-mail address: droopy@mail.ru, abengin@gmail.com

Despite the fact that engine manufacturers develop a new technology to reduce exhaust emissions, insufficient attention given to particulate emissions. However, diesel exhaust particles (DEP) are a major source of air-borne pollution, contain vast amount of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and may have deleterious effects on the immune system, resulting in the induction and enhancement of pro-allergic processes. In the current study, vehicle-emitted particles (VEP) from 2 different type of cars (diesel – D and gasoline – 80) and locomotive (L) were collected. Overall, 129 four week-old, male SPF-class Kunming mice were subcutaneously instilled with either 100, 250 or 500 mg/kg VEP and 15 mice receiving the solvent were assigned as control group. The systemic toxicity was evaluated and alterations in the immune status of mice were determined by the expression levels of CD3, CD4, CD8, CD16, CD25. Mice exposed to any dose of VEP showed significant increase in lung and spleen, with reduced thymus weights.

Despite the reduced amount of white blood cells of the mice that received either 100 mg/kg L-VEP or 100 and 250 mg/kg D-VEP and 80-VEP, the amount of basophils in their blood increased more than 10 times. On the other hand, VPE administration decreased the number of CD25+ cells slightly, whereas the number of cytotoxic T cells reduced 10-40 times compared to the control group. It can be concluded that VEPs may act as adjuvants in the immune system and induce the augmentation of pro-allergic responses. Thus, the adjuvant effects of VEP-PAHs emerge with the activation of basophils in an allergen independent fashion.

Work is supported by grant of Russian Science Foundation №15-14-20032.

Для заметок

Для заметок

АКТУАЛЬНЫЕ ГИГИЕНИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ НАНОТОКСИКОЛОГИИ:
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ,
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТИ
ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ И ПУТИ ЕЁ СНИЖЕНИЯ

Материалы Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

20–21 октября 2016 г.

г. Екатеринбург

978-5-93025-100-5



Отв. за техническое редактирование и издание А.В. Ярунин

Подписано в печать 11.09.2016 г. Формат 60x84 1/16. Усл. печ. л. 7,56. Тираж 500 экз.
Заказ № 277/16. Отпечатано в типографии ООО «ИРА УТК»,
г. Екатеринбург, ул. Шаумяна, 83.