

На правах рукописи

ШУМАКОВА АНТОНИНА АЛЕКСАНДРОВНА

ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ МИНЕРАЛЬНЫХ
ВЕЩЕСТВ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИОРИТЕТНЫХ
ХИМИЧЕСКИХ КОНТАМИНАНТОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ

14.02.01 – гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, г. Москва.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Гмошинский Иван Всеволодович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Хамидулина Халидя Хизбулаевна

доктор медицинских наук, заведующая кафедрой гигиены ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Минигалиева Ильзира Амировна

кандидат биологических наук, заведующая лабораторией промышленной токсикологии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (г. Пермь)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в ____ на заседании диссертационного совета Д. 208.133.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» МЗ РФ по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте Центра <http://www.sysin.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ингель Фаина Исааковна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Наночастицы (НЧ) и наноматериалы (НМ) искусственного происхождения рассматриваются как фактор, способный оказывать неоднозначное, в том числе, токсическое воздействие на организм человека и объекты окружающей среды [Тутельян В.А. и др., 2011; 2015; 2016]. По многим своим свойствам НЧ и НМ существенно отличаются от веществ того же химического состава, находящихся в форме протяжённых фаз или частиц микронного и более крупного размера. Это связано, в первую очередь, со свойствами межфазной границы НЧ, имеющей высокую кривизну, высокое значение химического потенциала поверхностно расположенных атомов и молекул, большую удельную площадь поверхности и, как следствие, повышенную реакционную, каталитическую, адсорбционную способность и растворимость. Из-за своего малого размера НЧ могут с большей лёгкостью, чем частицы более крупного размера, проникать через биологические барьеры, в том числе, через слизистую оболочку кишки, гематоэнцефалический и фетоплацентарный барьер, поступать в кровь и лимфу, распределяться и накапливаться во внутренних органах [Oberdorster G., 2005]. Вследствие этого комплекса факторов, НЧ и другие нанообъекты (нанотрубки, нановолокна и др.) должны рассматриваться как особая форма вещества с уникальными для неё биологическими и токсикологическими характеристиками [Рахманин Ю.А., 2014]. В соответствии с «Концепцией токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов», утверждённой постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации в 2007 году [Онищенко Г.Г. и др., 2007], наноматериалы должны быть отнесены к новым видам материалов и продукции, характеристика потенциального риска которых для здоровья человека и состояния среды обитания во всех случаях является обязательной. В Российской Федерации разработаны, утверждены и действуют более 50 нормативно-методических документов, устанавливающих порядок выявления, идентификации, оценки безопасности, контроля и оценки рисков наноматериалов и продукции наноиндустрии [Онищенко Г.Г. и др., 2013].

В процессе оценки риска НЧ и НМ, поступающих из окружающей среды, следует иметь в виду, что в большом числе случаев они воздействуют на организм человека не изолировано, а совместно с другими контаминантами, в том числе с ионами токсичных элементов.

При этом, исходя из общих представлений о физико-химических свойствах НЧ и НМ, можно ожидать взаимодействия этих веществ с ионами тяжёлых металлов, включая адсорбцию последних на НЧ, их совместный транспорт через биологические барьеры и бионакопление, что может потенциально приводить как к синергическим, так и антагонистическим эффектам в отношении проявляемой токсичности. Однако, до настоящего времени взаимное влияние этих двух групп потенциально опасных факторов друг на друга было изучено недостаточно. Согласно отдельным данным [Sun H. et al., 2009; Zhang X. et al., 2007], под действием НЧ токсичность ряда контаминантов может усиливаться

вследствие их проникновения во внутреннюю среду организма в адсорбированной на НЧ форме. Помимо этого простейшего механистического объяснения, возможно также взаимное усиление эффектов НЧ и контаминантов за счёт их вовлеченности в общие механизмы токсического действия, такие, как развитие оксидантного стресса, патологическая экспрессия генов провоспалительных белков, взаимное влияние на бионакопление и метаболизм биологически активных микроэлементов [Benetti F. et al., 2014].

В числе контаминантов, представляющих интерес с позиции исследования их возможного взаимодействия с НЧ и наноматериалами, наибольшее значение имеют свинец и кадмий. Эти металлы относятся к числу элементов, создающих наибольший риск для здоровья человека, ввиду их высокой токсичности, выраженной способности к кумуляции в организме, наличия нейротоксических (свинец) и канцерогенных (кадмий) свойств, широкого распространения в окружающей среде, способности передаваться по трофическим цепям в биосфере и контаминировать пищевую продукцию. Согласно официальным документам FAO-ВОЗ [ВОЗ, 2003] и российской нормативной базе [ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»] указанные вещества относятся к числу приоритетных контаминантов пищевой продукции, создающих наибольший вред для здоровья при поступлении в организм с пищей. С другой стороны, целый ряд искусственных НЧ и наноматериалов также могут присутствовать в составе пищевых продуктов, куда они могут поступать из объектов окружающей среды, либо вводиться преднамеренно, со специальными технологическими целями, например, в качестве пищевых добавок (в настоящее время это НЧ диоксида кремния, НЧ диоксида титана, серебра, в перспективе – фуллерены и фуллеренолы и другие). Совместное присутствие НЧ, свинца и кадмия в составе пищевой продукции гипотетически может стать источником агрегированного риска для здоровья человека, однако сама возможность проявления такого риска и его природа до настоящего времени изучены недостаточно.

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящей работы явилось изучение в эксперименте влияния наночастиц и наноматериалов на токсическое действие и бионакопление токсичных элементов, являющихся приоритетными контаминантами пищевых продуктов.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» в рамках тем №108 «Оценка безопасности различных видов наноматериалов, предлагаемых для использования в пищевой промышленности (наночастицы металлического серебра, оксидов железа, кремния, цинка и другие)» и №140 «Разработка критериев и определение биомаркеров воздействия искусственных наночастиц на организм при пероральном пути поступления».

Основные задачи исследования:

1. Изучить в эксперименте влияние перорально вводимых наночастиц и наноматериалов на бионакопление свинца и кадмия в организме животных.
2. В экспериментах на животных на моделях интоксикации свинцом и кадмием изучить влияние поступающих в желудочно-кишечный тракт

наноматериалов (наночастицы оксидов титана, кремния, алюминия, фуллеренол) на некоторые показатели токсического действия указанных контаминантов.

3. Изучить влияние свинца и кадмия в сочетании с перорально вводимыми наноматериалами на содержание и распределение в органах и тканях лабораторных животных ряда эссенциальных и токсичных элементов.

4. Оценить на модели *in vitro* параметры процессов адсорбции на наночастицах и наноматериалах свинца и кадмия.

5. Разработать унифицированные методы для оценки накопления в организме лабораторных животных токсичных элементов при их пероральном поступлении.

Научная новизна исследования:

Впервые с использованием *in vivo* моделей поступления свинца и кадмия у лабораторных животных установлено, что искусственные наноматериалы, такие как оксидные наночастицы и фуллеренол, при введении в желудочно-кишечный тракт способны оказывать разнонаправленное воздействие на процессы бионакопления свинца и кадмия, зависящие от природы наноматериала, его дозы, органа-мишени воздействия. Впервые показано, что при совместном пероральном поступлении НЧ оксида кремния и свинца наблюдается снижение всасывания и бионакопления последнего. Впервые выявлен специфический характер взаимодействия свинца с НЧ оксида алюминия, проявляющийся в достоверном повышении накопления токсиканта в печени крыс, снижении концентрации гемоглобина крови, увеличении экскреции с мочой 5-минолевуленовой кислоты и порфобилиногена. Впервые показано, что совместное поступление искусственных НЧ и некоторых контаминантов (кадмий, свинец) оказывает влияние на содержание в органах и тканях ряда эссенциальных (цинк, медь, марганец, кобальт) и токсичных (мышьяк, алюминий) элементов. Впервые в практике нанотоксикологии разработаны унифицированные подходы к изучению и оценке влияния искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие приоритетных контаминантов пищевой продукции.

Теоретическая значимость работы

Результаты настоящей работы по изучению комбинированного действия свинца и кадмия (приоритетных контаминантов пищевой продукции и объектов окружающей среды) и наночастиц и наноматериалов на бионакопление токсичных элементов являются основой для дальнейших исследований по оценке риска для здоровья человека их совместного поступления и дальнейшего совершенствования методов оценки безопасности и контроля наночастиц и наноматериалов в объектах окружающей среды и пищевой продукции.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования

Результаты проведенных исследований были использованы при разработке нормативно-методических документов:

1). МР 1.2.0054-11 «Порядок и методы оценки воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ. Методические рекомендации»;

2). МУ 1.2.2965-11 «Порядок медико-биологической оценки действия наноматериалов на лабораторных животных по морфологическим признакам и метаболическим параметрам. Методические указания».

Положения, выносимые на защиту

1. Гипотеза об однозначном увеличении поступления во внутреннюю среду организма и бионакопления токсичных элементов при их совместном поступлении с искусственными наноматериалами не получила экспериментального подтверждения.
2. Возможны эффекты как увеличения, так и уменьшения бионакопления и проявления токсического действия свинца при совместном поступлении с наноматериалами в зависимости от вида наноматериалов, характера их взаимодействия с ионами тяжелых металлов и механизмов их всасывания.
3. Совместное поступление наноматериалов, свинца и кадмия влияет на микроэлементный гомеостаз организма.
4. Параметры адсорбции ионов свинца и кадмия на наночастицах минеральных веществ в модельной системе *in vitro* согласуются с характером их влияния на бионакопление и токсическое действие этих токсичных металлов.

Достоверность полученных результатов

Сформулированные в диссертации научные положения и выводы основаны на анализе репрезентативного количества материала, полученного в экспериментальных исследованиях в общей сложности на 279 животных, с использованием апробированных в научной литературе моделей нелетальных интоксикаций и современных высокочувствительных аналитических методов исследования. Основные выводы и положения работы основываются на статистически достоверных эффектах, выявленных в экспериментальных исследованиях.

Апробация работы

Материалы диссертации были доложены на: XIII Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов «Питание и здоровье» с международным участием (г. Москва, 2011); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» с международным участием (г. Москва, 2012); Пленуме по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации «Научно-методологические и законодательные основы совершенствования нормативно-правовой базы профилактического здравоохранения: проблемы и пути их решения» (г. Москва, 2012); XIV Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Алиментарно-зависимая патология: предиктивный подход» (г. Москва, 2012); 7 Международном Конгрессе по Нанотоксикологии NanoTOX 2014 (г. Анталья, Турция, 2014); XV Всероссийском Конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Здоровое питание: от фундаментальных исследований к инновационным технологиям» (г. Москва, 2014); III Международной молодежной научно-практической конференции «Междисциплинарные проблемы нанотехнологий, биомедицины и нанотоксикологии» (г. Тамбов, 2015); VIII Всероссийской научно-практической

конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Московская область, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути её снижения» (г. Екатеринбург, 2016), XVII Всероссийском конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Лечебное, профилактическое и спортивное питание» (Москва, 29-31 октября 2018 г.).

Публикации

По теме диссертации всего опубликовано 13 печатных работ, из которых 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в зарубежном научном журнале, 7 тезисов в трудах российских и международных научных конференций.

Личный вклад автора составляет не менее 80% и заключается в сборе и анализе научной литературы по теме исследования, разработке дизайнов биологических экспериментов, отборе тестируемых образцов наноматериалов и их характеристике методом динамического рассеяния света, проведении подострых токсикологических исследований на лабораторных животных с введением исследуемых препаратов, отборе биологического материала, его анализе методами атомно-абсорбционной спектрометрии, масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, биохимическими аналитическими методами (хроматография, спектрофотометрия), статистической обработке, анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных. Все представленные в диссертации данные получены непосредственно самим соискателем.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 51 таблицу, 14 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, основной части, включающей разделы «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», выводов, списка использованных источников. Библиография включает 300 источников, в том числе, 55 – на русском языке и 245 – на английском.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные направления работы и выполненный объем исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Основные направления, объекты, методы и объем исследований

Направление исследований	Объекты исследований	Методы исследований	Объем исследований
Определение размеров частиц наноматериалов	НЧ TiO ₂ , НЧ SiO ₂ , НЧ Al ₂ O ₃ , фуллерен	Динамическое рассеяние света	4 вида НМ

Эксперименты <i>in vivo</i> по воспроизведению модели свинцовой интоксикации при комбинированном действии с НМ (НЧ TiO ₂ , НЧ SiO ₂ , НЧ Al ₂ O ₃ , фуллеренол)	Биологические жидкости и внутренние органы лабораторных животных: - цельная кровь - моча - печень, почки, селезенка, семенники, головной мозг	- Спектрофотометрия (определение гемоглобина, 5-АЛК и ПБГ): 311 ед. инф. - Атомно-абсорбционная спектрометрии (элементный профиль внутренних органов лабораторных животных): 547 ед. инф. - Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (элементный профиль внутренних органов лабораторных животных): 1968 ед. инф.	Крысы-самцы Вистар – 151 шт .
Эксперименты <i>in vivo</i> по воспроизведению модели кадмиевой интоксикации при комбинированном действии с НМ(НЧ TiO ₂ , НЧ SiO ₂ , фуллеренол)	Внутренние органы лабораторных животных: - печень, почки, головной мозг	- Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (элементный профиль внутренних органов лабораторных животных): 3303 ед. инф.	Крысы-самцы Вистар – 128 шт
Определение <i>in vitro</i> адсорбционной способности НМ	НЧ TiO ₂ , НЧ SiO ₂ , НЧ Al ₂ O ₃		168 ед. инф.
Итого: 279 крыс, 11430 ед. инф.			

Эксперименты проведены на 279 крысах самцах линии Вистар. Животные получали сбалансированный полусинтетический рацион на основе казеина, приготовленный в соответствии с МУ 1.2.2520-09. В качестве объектов исследования использовали НЧ оксида кремния (площадь поверхности 220 м²/г и 300 м²/г), оксида титана, оксида алюминия и фуллеренол C₆₀(ОН)₂₄.

Наночастицы оксида кремния (НЧ SiO₂), 220 м²/г

НЧ SiO₂ («Sigma-Aldrich», США; каталожный № 637238, М.м.=60,08 г/моль, CAS 7631-86-9) представляли собой порошок белого цвета, склонный к пылеобразованию, при растворении в воде дающий стойкую в течение не менее 3-5 минут суспензию молочно-белого цвета. Согласно спецификации производителя диаметр частиц в препарате составил 10-20 нм.

Наночастицы оксида кремния (НЧ SiO₂), 300 м²/г

НЧ SiO₂, 300 м²/г (ООО «Силика», Московская область, г. Долгопрудный, Россия) в соответствии со спецификацией изготовителя соответствовали ГОСТ

14922-77, и представляли собой рентгеноаморфный лёгкий белый порошок, дающий при диспергации ультразвуком в воде опалесцирующий бесцветный коллоидный раствор, стабильный в течение не менее 2 суток.

Наночастицы оксида титана (НЧ TiO_2).

НЧ TiO_2 рутильной формы («Sigma-Aldrich», США – Германия; каталожный № 637262, М.м.=79,87 г/моль) представляли собой лёгкий порошок белого цвета, негигроскопичный, склонный к пылеобразованию, при растворении в воде дающий стойкую в течение не менее 3-5 минут суспензию молочно-белого цвета. По результатам трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) препарат представлял собой стержневидные кристаллы диаметром 5-10 нм и длиной 40-50 нм [Р.В. Распопов и др., 2010].

Наночастицы оксида алюминия (НЧ Al_2O_3).

НЧ Al_2O_3 («Sigma-Aldrich», Австрия; каталожный №544833, М.м.=101,96 г/моль, CAS 1344-28-1) представляли собой порошок белого цвета, нерастворимый в воде и органических растворителях. Согласно спецификации производителя диаметр частиц в препарате составил <50 нм.

Фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$.

Использовали препарат фуллеренола (ЗАО «Фуллерен-Центр», г. Нижний Новгород, Россия). По данным производителя чистота препарата составляет около 98%.

Свинец уксуснокислых трехводный и хлорид кадмия 2,5-водный.

В качестве модельных токсикантов в экспериментах использовали свинец уксуснокислый трехводный Х.Ч. $(CH_3COO)_2Pb \times 3H_2O$ (далее- ацетат свинца) и хлорид кадмия 2,5-водный Х.Ч. $CdCl_2 \times 2,5H_2O$ (далее- хлорид кадмия), производства ООО «Хромресурс» (Россия) и ООО «Химмед» (Россия), соответственно.

Водные дисперсии исследуемых НМ готовили ежедневно и обрабатывали (за исключением фуллеренола) в течение 5 мин на погружном ультразвуковом процессоре с водяным охлаждением, при мощности импульса 30 Вт/см³ и частоте 20 кГц. Средний размер (гидродинамический диаметр) частиц и распределение по размерам измеряли методом динамического рассеяния света на приборе «Nanotracs Wave» (Microtracs Inc, США).

Дизайны токсикологических экспериментов были разработаны в соответствии с МУ 1.2.2520-09. На протяжении 5-ти экспериментов (21 – 28 сут) препараты НЧ и фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ вводили животным ежесуточно внутрижелудочно однократно через зонд в указанных ниже дозах. Объем вводимой дисперсии для всех животных составлял 1 мл раствора на каждые 100 г массы тела животного.

В ходе всех токсикологических экспериментов крыс всех групп еженедельно взвешивали на электронных весах с точностью $\pm 0,5$ г и оценивали на протяжении всего эксперимента и по его окончании прирост массы тела, интегральные показатели (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстяного покрова, потребление корма). За 12 часов до выведения из эксперимента у животных забирали всю пищу, доступ к воде не ограничивали. По окончанию эксперимента животных обескровливали из нижней полой вены

под ингаляционной анестезией диэтиловым эфиром (ФСП 42-0518-5003-04). Весь инструмент и используемую посуду стерилизовали в течение 12-часов в 96% растворе этилового спирта. После вскрытия животных оценивали абсолютную и относительную массу внутренних органов (печень, почки, сердце, легкие, селезенка, надпочечники, семенники, тимус, головной мозг).

Исследование по воспроизведению модели свинцовой интоксикации при совместном введении с НЧ TiO_2 продолжительностью 23 сут выполняли на 26 крысах исходной массой тела 140 ± 4 г ($M \pm m$). Животные были разделены на 3 группы по 8-9 крыс в каждой. Крысы группы 1 (контроль Pb) получали раствор ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела в пересчете на свинец. Животные групп 2 и 3, которым также вводили ацетат свинца в той же дозе, дополнительно получали дисперсию НЧ TiO_2 в дозе 1 и 100 мг/кг массы тела.

Эксперимент по воспроизведению модели свинцовой интоксикации при совместном введении с НЧ SiO_2 ($220 \text{ м}^2/\text{г}$), продолжительностью 21 сутки проводили на 27 крысах исходной массой тела 80 ± 8 г ($M \pm m$). Животные были разделены на 3 группы по 9 крыс в каждой. Животные группы 1 (контроль Pb) получали раствор ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела в пересчете на свинец. Животные групп 2 и 3, которым также вводили ацетат свинца в той же дозе, дополнительно получали дисперсию НЧ SiO_2 в дозе 1 и 100 мг/кг массы тела.

В эксперименте по воспроизведению модели свинцовой интоксикации при совместном введении с НЧ SiO_2 ($300 \text{ м}^2/\text{г}$), продолжительностью 22 суток использовали 62 крысы исходной массой тела 135 г ($M \pm m$). Животные были разделены на 6 групп по 10-11 крыс в каждой. Животным 1-й группы (контроль) вводили дистиллированную воду. Крысы 2-й и 3-й групп получали дисперсию НЧ SiO_2 в дозах 1 и 100 мг/кг м.т. соответственно. Крысам 4 группы (контроль Pb) вводили в раствор ацетата свинца в дозе 20 мг/кг м.т. (в расчете на свинец) в целях воспроизведения модели свинцовой интоксикации, а крысам 5 и 6 групп на фоне введения ацетата свинца в той же дозе дополнительно вводили дисперсию НЧ SiO_2 в дозах, соответственно, 1 и 100 мг/кг массы тела.

Модель свинцовой интоксикации при совместном введении с НЧ Al_2O_3 продолжительностью 22 суток воспроизводили на 36 крысах исходной массой тела 128 ± 4 г ($M \pm m$). Животные были разделены на 4 группы по 8-10 крыс в каждой. Крысы группы 1 (контроль H_2O) получали дистиллированную воду. Животные группы 2 (контроль Pb) получали раствор ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела в пересчете на свинец. Животные групп 3 и 4, которым также вводили ацетат свинца в той же дозе, дополнительно получали дисперсию НЧ Al_2O_3 в дозе 1 и 100 мг/кг массы тела.

В эксперименте по воспроизведению модели кадмиевой интоксикации при совместном введении с НЧ TiO_2 (рутил), высокодисперсным аморфным SiO_2 и фуллеренолом $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ продолжительностью 28 суток использовали 128 крысах исходной массой тела 56-109 г ($M \pm m$). Животные были разделены на 8 групп по 16 крыс в каждой. Животным 1-й группы (контроль вода) вводили внутрижелудочно через зонд дистиллированную воду. Крысы 2-й группы

(контроль Cd) получали раствор хлорида кадмия в дозе 1 мг/кг массы тела (в расчете на кадмий). Животные оставшихся 6-ти опытных групп на фоне введения CdCl₂ получали исследуемые НМ в дозах, указанных в таблице 2.

Таблица 2 - Схема 28-суточного эксперимента с кадмием и наноматериалами

Группы животных	CdCl ₂ , мг/кг м.т./сутки (в пересчете на Cd)	НЧ TiO ₂ (рутил), мг/кг м.т./сутки	НЧ SiO ₂ , 300 м ² /г, мг/кг м.т./сутки	Доза фуллеренола C ₆₀ (OH) ₂₄ , мг/кг м.т./сутки
1	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	1	0	1	0
4	1	0	100	0
5	1	1	0	0
6	1	100	0	0
7	1	0	0	1
8	1	0	0	10

По окончании экспериментов отбирали цельную кровь для определения концентрации гемоглобина спектрометрическим методом с использованием наборов реагентов «ЭКОлаб-Гемоглобин» (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) и органы (печень, почки, селезенка, семенники, головной мозг) для определения содержания в них Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Zn методом атомно-абсорбционной спектрометрии с дейтериевой коррекцией на приборе «SOLAAR 969» («UNICAM», Великобритания) и методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ICP-MS серии 7700x («Agilent Technologies», Япония). На 20-е сутки эксперимента проводили сбор суточной мочи, в которой определяли 5-аминолевуленовую кислоту (5-АЛК) и порфибилиноген (ПБГ) спектрофотометрическим методом с использованием наборов фирмы «Biosystems S.A» (Испания).

Исследование адсорбционной способности наноматериалов в модельных системах *in vitro*

Для определения адсорбционной способности трех видов НЧ по отношению к ионам Pb²⁺ и Cd²⁺ была проведена серия экспериментов *in vitro*. В качестве буфера был выбран 0,05 М раствор бикарбонатного буфера (NaHCO₃) pH 8,0, воспроизводящий ионный состав энтеральной среды.

Суспензии НЧ SiO₂, TiO₂ и Al₂O₃ в буферном растворе обрабатывали на ультразвуковом погружном диспергаторе при мощности 2 Вт/см³ в течение 5 минут. Далее делали серию разведений, как представлено в таблицах 3 и 4, таким образом, чтобы конечный раствор имел объем 6 мл (3 см³ раствора ионов металла + 3 см³ суспензии НЧ).

Таблица 3 - Концентрация растворов свинца для инкубации

Концентрация НЧ, 1 мг/см ³	Исходная концентрация свинца, мкмоль/дм ³						
	НЧ TiO ₂	250,0	125,0	62,5	31,2	15,6	7,8
НЧ Al ₂ O ₃	250,0	125,0	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9
НЧ SiO ₂	250,0	125,0	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9

Таблица 4 - Концентрация растворов кадмия для инкубации

Концентрация НМ, 1 мг/см ³	Исходная концентрация кадмия, мкмоль/дм ³					
	НЧ TiO ₂	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0
НЧ Al ₂ O ₃	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0	10,0
НЧ SiO ₂	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0	10,0

Инкубацию проводили в термостате при температуре +37°C в течение 3 часов. После этого пробирки центрифугировали при 4500 об/мин, t=22°C в течение 30 мин. Далее в надосадочной жидкости проводили количественное определение содержания свинца и кадмия методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ICP-MS серии 7700x («Agilent Technologies», Япония).

Статистический анализ данных выполняли с использованием компьютерной программы SPSS (Statistical Package for Social Sciences, США), по показателям описательной статистики (M - среднее арифметическое, Me - медиана, Sd - стандартное отклонение, m – стандартная ошибка среднего). Однородность распределения в совокупности сравниваемых групп проверяли согласно критерию ANOVA (тест на остаточную дисперсию) и непараметрическому ранговому критерию Крускала-Уоллиса (односторонний дисперсионный анализ, для проверки равенства медиан нескольких выборок). Проверку гипотезы о совпадении функции распределения двух сравниваемых групп выполняли согласно непараметрическому ранговому тесту Манна-Уитни. Оценку значимости отдельных воздействующих факторов проводили с использованием однофакторного анализа (проверка однородности распределения тестируемого показателя в группах по факторам: а) наличия свинца/кадмия; б) наличия НЧ с использованием теста на остаточную дисперсию ANOVA). Различия между группами животных признавали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Физико-химические характеристики применяемых препаратов наночастиц и наноматериалов

Анализ размеров частиц, проведенный методом динамического рассеяния света, показал, что изученные препараты НЧ находились в нанодиапазоне, таким образом, изучаемые препараты следует рассматривать как НМ:

- НЧ TiO₂: две размерные фракции частиц со среднечисловым эффективным гидродинамическим диаметром 44 нм (51,5%) и 103,6 нм (48,5%);

- НЧ Al_2O_3 : одна размерная фракция частиц со среднечисловым эффективным гидродинамическим диаметром 63,7 нм;

- НЧ $SiO_2(300 \text{ м}^2/\text{г})$: одна размерная фракция частиц со среднечисловым эффективным гидродинамическим диаметром 30,2 нм;

- Фуллеренол в концентрации 1%: одна размерная фракция частиц со среднечисловым эффективным гидродинамическим диаметром 73,1 нм.

На всех рисунках: ось абсцисс - размер частиц, нм; ось ординат: слева – доля частиц с размером не менее данного, % (кривая); справа – доля частиц в интервале размеров, % (гистограмма)

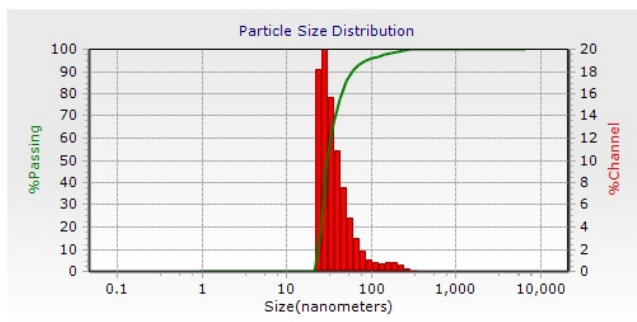


Рисунок 1 - Распределение частиц НЧ $SiO_2(300 \text{ м}^2/\text{г})$

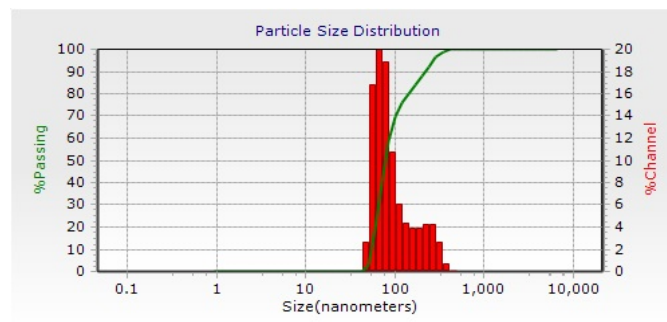


Рисунок 2 - Распределение частиц в препарате фуллеренола, $c=1\%$

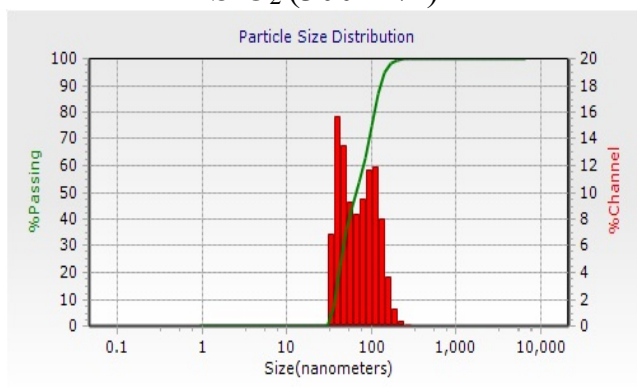


Рисунок 3 - Распределение частиц НЧ TiO_2

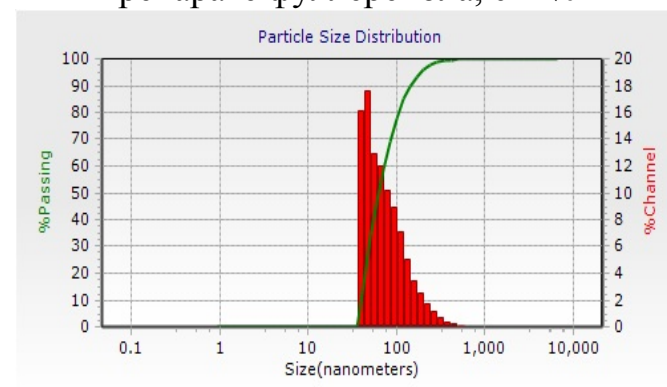


Рисунок 4 - Распределение частиц в препарате НЧ Al_2O_3

3.2 Изучение совместного поступления свинца и наночастиц диоксида титана в эксперименте

В эксперименте при совместном введении свинца и НЧ TiO_2 было выявлено снижение концентрации Pb в крови с возрастанием дозы НЧ TiO_2 , что может свидетельствовать о влиянии НЧ TiO_2 состоящем в усилении токсичности свинца. Имелась тенденция (хотя и недостоверная) усиления накопления свинца в печени, что коррелирует со снижением концентрации Pb в крови и свидетельствует об увеличении поступления свинца в организм и, соответственно, увеличении проявления его токсичности при его совместном поступлении с НЧ TiO_2 (табл. 5). Вместе с тем, под воздействием НЧ TiO_2 значительно снижалось накопление Pb в почках, селезенке, мозге и семенниках.

Полученные данные позволили предположить, что во взаимодействии НЧ TiO_2 с ионами Pb^{2+} , основную роль играет, по-видимому, адсорбция в просвете кишки. НЧ TiO_2 при довольно высоких дозах поступления свинца (в настоящем

эксперименте), могут в определенной степени увеличивать всасывание свинца (о чем свидетельствует увеличение его содержание в печени) и, соответственно, увеличивает его токсическое действие (снижение концентрации Hb в крови). С другой стороны, имеет место печеночно-кишечная рециркуляция свинца и, возможно, определенное количество свинца элиминируется из печени, вновь адсорбируется на остальной части НЧ TiO₂ в просвете кишечника и выводится из организма, о чем может свидетельствовать снижение содержания свинца в почках, селезенке, семенниках и головном мозге. Таким образом, эффекты влияния НЧ TiO₂ на процессы бионакопления свинца и его токсичность являются, в определенном смысле, независимыми.

Таблица 5 - Содержание гемоглобина в крови и свинца в органах крыс (M±m)

Группы №№	Число крыс	Hb, г/дм ³	Содержание свинца, мг/кг массы ткани, M±m				
			Печень	Почки	Селезёнка	Семенники	Головной мозг
1	6	156,0±5,1	0,70±0,11	15,07±1,18	0,78±0,13	0,43±0,17	0,45±0,04
2	7	142,5±4,8	0,95±0,24	11,14±1,54	0,66±0,18	0,11±0,03	0,41±0,05
3	9	129,3±4,4 ¹	0,86±0,17	7,50±1,10 ^{1,2}	0,45±0,10	0,09±0,03 ¹	0,28±0,09 ¹
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		0,003	>0,05	0,004	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P	НЧ TiO ₂	0,004	>0,05	0,006	>0,05	0,013	>0,05

¹- различия достоверны с гр.1 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

²- различия достоверны с гр.2 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

3.3 Изучение комбинированного действия свинца и наночастиц диоксида кремния (220 м²/г, 300 м²/г)

Как показали результаты проведенных исследований, при совместном введении свинца и НЧ SiO₂ с площадью поверхности 220 м²/г в течение первых 7 дней эксперимента животные, получавшие только НЧ SiO₂, характеризовались большей прибавкой массы тела, а в конце эксперимента у них отмечалась достоверно меньшая относительная масса (ОМ) печени, увеличение концентрации Hb в крови и снижение экскреции 5-АЛК с мочой (табл. 6) по сравнению с группой, получавшей только свинец, что свидетельствует о снижении тяжести свинцовой интоксикации под действием этих НЧ. Одновременно, определение свинца в органах (печень, почки, селезенка, семенники, головной мозг) не показало увеличения его накопления при его

комбинированном введении с НЧ SiO₂, по сравнению с группой животных, которым вводили только свинец.

Таким образом, можно заключить, что НЧ SiO₂ с удельной площадью поверхности 220 м²/г способны в определенной степени адсорбировать свинец в просвете кишечника и тем самым снижать его всасывание и дальнейшее поступление в органы, что, в конечном итоге приводит даже к некоторому снижению проявления токсичности свинца. Т.к. в данном модельном эксперименте использовались достаточно высокие дозы свинца, возможно, что при низких его дозах эффект снижения всасывания и проявления токсичности свинца будет проявляться в ещё большей степени.

Таблица 6 – Содержание Hb в крови, 5-АЛК в моче и ОМ печени животных.

Группы №№	Число крыс	Hb, г/дм ³	5-АЛК, мкмоль/ сутки	ОМ печени, %
1	6	129,0±2,6	5,00±0,82	4,17±0,08
2	7	139,5±2,4 ¹	3,52±0,76	3,94±0,08
3	9	160,2±8,0 ^{1,2}	3,33±0,37	3,76±0,07 ¹
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		0,001	>0,05	0,003
Факторный анализ, ANOVA, P	НЧ SiO ₂ (220 м ² /г)	0,009	>0,05	0,002

¹- различия достоверны с гр.1 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

²- различия достоверны с гр.2 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

Таблица 7 - Прирост МТ крыс за 28 дней, экскреция 5-АЛК и порфобилиногена с мочой, концентрация Hb в крови, содержание свинца и некоторых других элементов в органах крыс (M±m)

Группы №№	Число крыс	Прирост МТ за 28 дней, г	5-АЛК, мкмоль/сутки	ПБГ, мкмоль/сутки	Hb в крови, г/дм ³	Pb в печени, мг/кг	Pb в почках, мг/кг	Pb в мозге, мг/кг	Al в печени, мг/кг	Se в почках, мг/кг
1	8	143,8±6,4	1,35±0,10	0,029±0,01	124,1±2,9	0,11±0,060	0,049±0,011	0,053±0,008	0,60±0,095	1,42±0,084
2	8	153,9±8,3	1,11±0,16	0,0088±0,0019	128,9±3,0	0,029±0,005	0,043±0,005	0,039±0,005	0,56±0,067	1,39±0,034
3	8	125,0±9,6	1,12±0,17	0,038±0,0059	141,2±4,8 ¹	0,028±0,009	0,041±0,005	0,031±0,005 ¹	0,52±0,054	1,37±0,044
4	8	121,2±9,6	6,02±0,73 ¹	0,060±0,013	115,7±2,1 ¹	3,67±0,47 ¹	12,40±1,71 ¹	0,71±0,11 ¹	0,47±0,065	1,16±0,043 ¹
5	8	128,4±10,0	6,40±0,37 ^{1,2}	0,11±0,008 ^{2,2}	125,0±2,7	3,14±0,36 ^{1,2}	10,53±1,24 ^{1,2}	0,65±0,032 ^{1,2}	0,43±0,030	1,08±0,019 ^{1,2}
6	8	104,3±12,9 ¹	5,53±0,79 ^{1,3}	0,056±0,021	126,1±5,2	2,91±0,27 ^{1,3}	12,64±0,84 ^{1,3}	0,70±0,088 ^{1,3}	0,86±0,085 ^{3,4}	1,20±0,050 ^{1,3}
Однородность распределения, гр.1-6, ANOVA, P		0,012	3,63×10⁻¹¹	3,63 × 10⁻¹¹	0,00038	>0,05	4,05×10⁻¹⁵	2,49×10⁻¹⁰	0,022	0,000042
Факторный анализ, ANOVA, P	НЧ SiO ₂ (300мг/г)	>0,05	>0,05	>0,05	0,0032	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

¹- различия достоверны с гр.1 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

²- различия достоверны с гр.2 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

³- различия достоверны с гр.3 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

⁴- различия достоверны с гр.3 по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

При комбинированном введении животным свинца и НЧ SiO_2 ($300 \text{ м}^2/\text{г}$) также не было установлено однозначных свидетельств потенцирования неблагоприятных эффектов (табл. 7). В группах животных, получавших свинец и НЧ SiO_2 в наибольшей дозе, наблюдалось снижение прироста массы тела за 28 дней ($p_{1-6} < 0,05$), что не отмечалось при введении как НЧ, так и свинца по отдельности. Экскреция 5-АЛК с мочой у животных 4-ой группы, получавших Pb, многократно и достоверно увеличивалась по сравнению с животными контрольной группы ($p_{1-4} < 0,05$), что является характерным признаком воздействия свинца на организм. Аналогичная динамика была отмечена и в отношении экскреции с мочой порфобилиногена. При этом также не было обнаружено зависимости экскреции 5-АЛК и порфобилиногена от дозы вводимых НЧ SiO_2 .

Отдельно стоит отметить обнаруженный эффект, вызванный введением НЧ SiO_2 ($300 \text{ м}^2/\text{г}$) в отношении концентрации Hb в крови. Введение только НЧ SiO_2 приводило к достоверному ($p_{1-3} < 0,05$) увеличению содержания Hb в крови у животных этой группы. У крыс 4-ой группы, получавших только Pb, как и следовало ожидать, отмечалось достоверное ($p_{1-4} < 0,05$) снижение концентрации Hb в крови. Дополнительное введение крысам, получавшим свинец, НЧ SiO_2 в обеих дозах возвращало содержание Hb в крови практически на контрольный уровень ($p_{1-5;1-6} > 0,05$). Следует отметить, что аналогичный эффект в отношении содержания Hb в крови имел место и при введении свинца и НЧ SiO_2 другой размерности ($220 \text{ м}^2/\text{г}$). Сравнивая результаты двух экспериментов с использованием НЧ SiO_2 различной дисперсности можно констатировать, что совместное введение свинца и НЧ SiO_2 частично отменяет эффект снижения содержания Hb в крови под влиянием свинца. Этот эффект, по-видимому, может быть объяснен как размерностью НЧ SiO_2 (на что указывает и проведенный однофакторный анализ в обоих экспериментах), так и, возможно, дозой используемых НЧ.

Изучение распределения свинца по органам показало существенное его накопление в печени, почках и головном мозге у всех животных, получавших свинец ($p_{1-4} < 0,05$), однако под действием обеих доз использованных НЧ SiO_2 ($300 \text{ м}^2/\text{г}$) не происходило дальнейшего усиления накопления токсиканта во всех изученных органах ($p_{4-5,4-6} > 0,05$).

С учетом известных эффектов свинца в отношении гомеостаза большого числа эссенциальных и токсичных элементов представляло интерес исследование элементного профиля органов крыс. Содержание в печени таких элементов, как Cd, As, Se, Zn, Cu, Al, Cr, Mn, Co было в целом аналогичным у животных, получавших и не получавших свинец, и не показывало зависимости от дозы введенных НЧ SiO_2 . Введение НЧ SiO_2 не приводило, во всяком случае, к увеличению накопления в печени таких токсичных элементов, как Cd и As, и к снижению тканевых запасов ряда эссенциальных микроэлементов (Se, Cu, Cr и Co) как при наличии, так и в отсутствие свинцовой интоксикации. Что же касается уровней Zn и Mn, то их содержание в печени оказывается даже достоверно выше (хотя и незначительно по абсолютной величине) у животных, получавшей наибольшую дозу НЧ SiO_2 по сравнению с контрольной группой (p_{1-}

$p < 0,05$). Единственным предположительно неблагоприятным воздействием на элементный профиль является почти двукратное достоверное увеличение содержания в печени Al у животных, получавших свинец и НЧ SiO₂ в наибольшей дозе ($p_{4-6} < 0,05$). В отсутствие экспозиции свинцом подобный эффект не наблюдался. Увеличение накопления Al в печени крыс при совместном введении НЧ SiO₂ и Pb в настоящее время не вполне понятно и требует проведения дополнительных исследований (таблица 7).

Содержание элементов в почках не изменяется при свинцовой интоксикации ($p_{1-4} > 0,05$) при сравнении с животными группы 1, за исключением Se. Совместное введение Pb и НЧ SiO₂ приводило к достоверному снижению содержания Se в почках (эффект был связан с поступлением Pb, но не с НЧ SiO₂), чего не наблюдалось в печени и головном мозге. Содержание в головном мозге других изученных элементов не изменялось по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, на основании всей совокупности полученных данных можно заключить, что исходная гипотеза о потенцировании возможного токсического действия свинца вследствие его транспорта в форме, связанной с данным видом НЧ, не получает экспериментального подтверждения. Наоборот, имеет место некоторое снижение в присутствии НЧ SiO₂ токсического действия свинца, выражающееся в увеличении концентрации Hb в крови, стабилизации, или даже в тенденции к снижению, экскреции 5-АЛК и порфобилиногена с мочой. Следует отметить, что совместное поступление Pb и НЧ SiO₂ приводило к накоплению Al в печени и снижению содержания Se в почках, чего не наблюдалось при введении только НЧ SiO₂.

3.4 Изучение комбинированного воздействия на организм крыс ацетата свинца и наночастиц оксида алюминия

В ходе эксперимента было установлено достоверное увеличение ОМ почек ($p_{1-2,1-3,1-4} < 0,05$) и селезенки ($p_{1-2,1-4} < 0,05$) по мере возрастания дозы вводимых НЧ на фоне свинцовой интоксикации по сравнению с группой контрольных животных.

Экскреция 5-АЛК и ПБГ с мочой животных, получавших свинец и свинец с НЧ Al₂O₃, достоверно увеличивалась по сравнению с животными 1-й контрольной группы ($p_{1-2,1-3,1-4} < 0,05$). При этом зависимости этого показателя от дозы вводимых НЧ Al₂O₃ не наблюдалось ($p_{2-3,2-4,3-4} > 0,05$). Определение Hb в крови показало, что его концентрация достоверно снижалась у всех животных, получавших свинец, по сравнению с животными 1-й группы ($p_{1-2,1-3,1-4} < 0,05$). При этом зависимость этого показателя от дозы НЧ Al₂O₃ также отсутствовала ($p_{2-3,2-4} > 0,05$).

Изучение содержания свинца в печени, почках, селезенке и головном мозге показало его многократное и достоверное увеличение у животных группы 2, которым вводили только свинец, по сравнению с животными контрольной группы ($p_{1-2} < 0,05$). При этом, у животных, получавших свинец совместно с НЧ, его содержание в печени возрастало с увеличением их дозы. Увеличение содержания свинца в семенниках было значительно менее заметным. Следует отметить тот факт, что, в отличие от печени, комбинированное введение свинца

и НЧ Al_2O_3 в разных дозах не приводило к дальнейшему накоплению свинца в почках, семенниках и головном мозге, по сравнению с животными, которым вводили только свинец.

Таким образом, предполагаемый эффект усиления токсичности ионов тяжёлых металлов вследствие их транспорта через биологические барьеры в связанной с НЧ форме находит подтверждение для частного случая взаимодействия свинца с НЧ Al_2O_3 . Известные для НЧ Al_2O_3 эффекты не исключают возможности их частичного растворения в биологическом окружении с высвобождением как поверхностно связанных ионов свинца, так и растворимых форм Al^{+3} . Следует отметить, что эффект накопления Al в печени нами был обнаружен при совместном поступлении свинца и НЧ SiO_2 при том, что в эксперименте животным дополнительно не вводили Al . Таким образом, полученные результаты показывают, что НЧ Al_2O_3 в случае их присутствия в качестве потенциальных контаминантов в пищевой продукции, способны усиливать бионакопление свинца и увеличивать его токсичность.

3.5 Влияние наночастиц диоксида титана, диоксида кремния (300 м²/г) и фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ при их совместном поступлении с кадмием на распределение токсичных и эссенциальных элементов

При изучении комбинированного действия на организм крыс кадмия и НМ не наблюдалось изменений как в абсолютном, так и в относительном приросте массы тела во всех группах животных, летальности и признаков заболеваемости. Изучение влияния НМ на накопление кадмия в органах и тканях показало достоверное увеличение его содержания в печени крыс, получавших НЧ SiO_2 , наиболее заметное при высокой дозе НМ. В остальных органах (почки, головной мозг) прослеживалась только недостоверная тенденция к увеличению содержания кадмия на фоне введения данного вида НЧ, причем только при их низкой дозе. Достоверного влияния НЧ TiO_2 на накопление кадмия выявлено не было, а фуллеренол достоверно увеличивал накопление элемента в печени только в низкой дозе. Эти данные подтверждают предположение о том, что в определенных случаях накопление кадмия может быть повышено за счет усиления его проникновения через биологические барьеры организма под воздействием НМ, однако данный эффект зависит как от природы НМ, так и от используемой биологической модели.

Совместное введение кадмия и НМ приводило к разнонаправленным эффектам в отношении микроэлементного гомеостаза организма. Так, наблюдалось снижение содержания свинца в печени животных, получавших вместе с кадмием НЧ SiO_2 и фуллеренол в низких дозах, а также НЧ TiO_2 в высокой дозе. Зависимость данного эффекта только от дозы НЧ TiO_2 согласуется с установленным нами эффектом подавления абсорбции этого металла в присутствии НЧ TiO_2 , предположительно, по механизму энтеросорбции. Что же касается НЧ SiO_2 и фуллеренола, то их возможное влияние на обмен свинца реализуется по иному механизму, однако для выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Уровень Zn в печени недостоверно возрастал у животных, получавших кадмий, однако это различие увеличивалось и становилось статистически

достоверным, если одновременно с кадмием животные получали НЧ SiO₂ (в высокой дозе), НЧ TiO₂ (в низкой дозе) и фуллеренол (в обеих дозах). Содержание Zn в почках возрастало у всех животных, получавших кадмий, причем достоверно - в группе без НЧ (2-ая группа), при поступлении высоких доз фуллеренола, НЧ SiO₂ и обеих доз НЧ TiO₂. В головном мозге значимых эффектов в уровне Zn выявлено не было, за исключением снижения его содержания при высокой дозе фуллеренола. Эффект взаимодействия на системном уровне микроэлементов Zn и кадмия известен из литературы и связан с усилением под действием ионов кадмия имеющей протективное значение экспрессии транспортного белка металлотионеина, связывающего этот токсикант, и, одновременно, являющегося акцептором и переносчиком Zn и ряда других двухвалентных катионов. Изменения в бионакоплении кадмия, вызываемые использованными НЧ, в особенности, НЧ SiO₂, способны, как следует из полученных данных, влиять также и на бионакопление Zn, обусловленное функционированием этого общего транспортного механизма.

В содержании Cu в печени крыс достоверных изменений выявлено не было, за исключением небольшого по абсолютной величине (на 14%), но достоверного увеличения содержания у животных, получавших фуллеренол в низкой дозе. При этом в почках содержание Cu достоверно возрастало у животных, получавших кадмий (группа 2) и его комбинации с низкими дозами НЧ TiO₂ и НЧ SiO₂ и высокой дозой фуллеренола. У остальных животных, получавших Cd, содержание в почках Cu было увеличено недостоверно. В головном мозгу небольшое (на 15%) увеличение содержания Cu отмечено только у животных, получавших Cd с высокой дозой НЧ SiO₂.

Содержание Mn достоверно возрастало в головном мозге у животных в группах 3 и 4 (кадмий + НЧ SiO₂) по сравнению с животными контрольной группы 1 и имело тенденцию к увеличению по сравнению с животными группы 2. Хотя по абсолютной величине (максимум 13%) данный эффект был небольшим, его следует рассматривать как неблагоприятный, учитывая высокую нейротоксичность ионов Mn. В печени увеличивалось содержание Mn в результате поступления кадмия совместно с НЧ SiO₂ в высокой дозе (группа 4) и обеих доз фуллеренола (группы 7, 8). Этот результат трудно интерпретировать однозначным образом, учитывая роль Mn как токсичного металла и, одновременно, эссенциального микроэлемента-антиоксиданта. Можно предположить, что одной из причин усиления бионакопления Mn может быть компенсаторная тканевая экспрессия Mn-зависимой супероксиддисмутазы в ответ на оксидантный стресс, вызванный введением высоких доз Cd.

В числе других эффектов комбинированного воздействия кадмия и наноматериалов на бионакопление элементов следует указать на достоверное увеличение содержания мышьяка в печени у животных в группе 4 (НЧ SiO₂, 100 мг/кг м.т.) и в почках в группе 8 (фуллеренол, 10 мг/кг м.т.), никеля в почках в группе 3 (НЧ SiO₂, 1 мг/кг м.т.). Все эти эффекты были относительно невелики по абсолютной величине и не проявлялись при действии кадмия как такового (группа 2), то есть могли быть соотнесены исключительно с приемом наноматериалов.

Таким образом, в результате изучения влияния комбинированного Cd и трех видов наноматериалов на содержание эссенциальных и токсичных элементов в органах и тканях было выявлено большое число эффектов, характеризующихся в целом следующими особенностями:

1) органоспецифичность – разные элементы по-разному распределяются в печени, почках и головном мозге;

2) возможная неблагоприятная направленность, свидетельствующая об усилении токсического действия для некоторых из этих эффектов, например, увеличение накопления Mn в мозге, Cu в почках;

3) компенсаторный характер ряда других изменений, обусловленный зависящей от Cd экспрессией транспортных белков (пример - изменения в бионакоплении Zn);

4) выраженность многих эффектов не зависит от дозы НЧ, либо парадоксальным образом проявляется только при низких, но не при высоких дозах наноматериалов.

То, что многие из обнаруженных эффектов комбинированного воздействия кадмия и НЧ не показывают простой зависимости от дозы вводимых НЧ, должно рассматриваться при оценке возможных рисков, создаваемых НЧ/НМ в отношении токсичных элементов, присутствующих в пищевых продуктах и объектах окружающей среды в крайне малых дозах.

В результате изучения влияния искусственных НМ на содержание токсичных и эссенциальных элементов по органам показано наличие как синергических, так и антагонистических эффектов различных видов наноматериалов при их совместном поступлении с кадмием.

3.6 Определение термодинамических параметров адсорбции ионов свинца и кадмия на наночастицах диоксида кремния (300 м²/г), диоксида титана и оксида алюминия

В таблице 8 приведены расчетные величины параметров адсорбции (A_{\max} – максимальная предельная адсорбция, соответствующая насыщению адсорбционного слоя, мкмоль/мг; b – константа нестойкости связывания (концентрация 50%-связывания), мкмоль/мг), а на рисунке 5 – уравнения изотерм адсорбции в двойных обратных координатах.

Таблица 8 - Изотермы адсорбции A_{\max} и b в двойных обратных координатах

	Тип наночастиц		
	НЧ TiO ₂	НЧ Al ₂ O ₃	НЧ SiO ₂
Свинец	$A_{\max}=11,3$ мкмоль/дм ³ $b=11,8$ мкмоль/мг	$A_{\max}=13,1$ мкмоль/дм ³ $b=33,0$ мкмоль/мг	$A_{\max}=14,7$ мкмоль/дм ³ $b=1,6$ мкмоль/мг
Кадмий	$A_{\max}=0,16$ мкмоль/дм ³ $b=10,72$ мкмоль/мг	$A_{\max}=0,067$ кмоль/дм ³ $b=12,45$ мкмоль/мг	$A_{\max}=0,24$ мкмоль/дм ³ $b=12,19$ мкмоль/мг

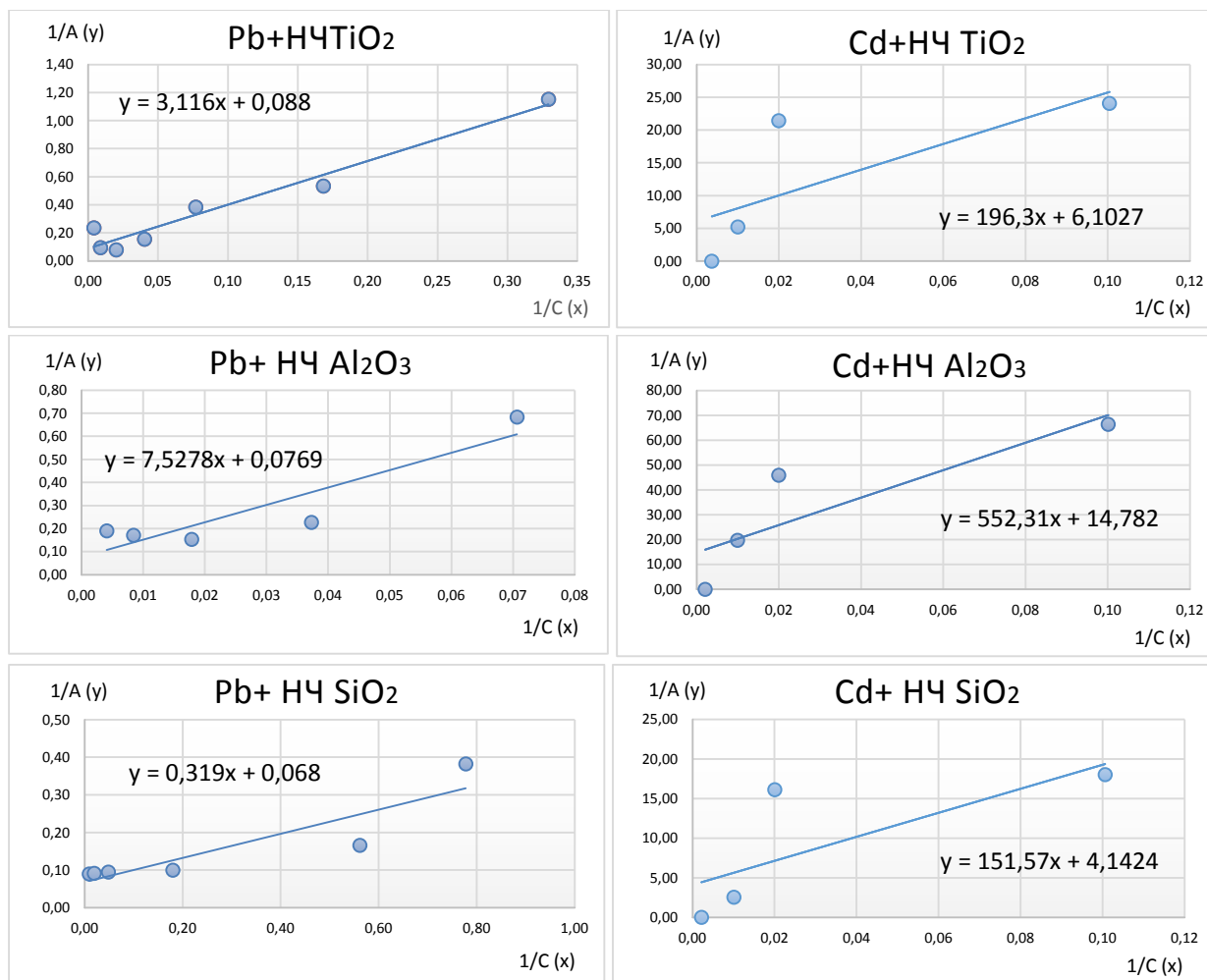


Рисунок 5 - Изотермы адсорбции свинца и кадмия на наночастицах. Ось x (1/C): величина, обратная остаточной концентрации элемента в надосадочной жидкости (C). Ось y (1/A): величина, обратная адсорбции (A)

Из полученных данных следует, что в случае адсорбции свинца на НЧ TiO₂, НЧ SiO₂ и НЧ Al₂O₃ выполняется уравнение однослойной равновесной изотермы адсорбции по Ленгмюру. Максимальная адсорбция Pb²⁺ на трех видах НЧ различается незначительно. Вместе с тем, прочность связывания (средство), являющееся величиной, обратной по отношению к константе b, оказывается наибольшей в случае использования НЧ SiO₂ и наименьшей - в случае НЧ Al₂O₃. Отсюда можно предположить, что в условиях *in vivo* в случае НЧ SiO₂, слабо всасываемых в кишечнике, преобладает более прочное связывание ионов свинца с этими НЧ с их удерживанием в просвете кишки. В случае использования НЧ Al₂O₃ связывание свинца с ними оказывается менее прочным, что создает условия для динамического равновесия адсорбции-десорбции свинца в свободном и/или связанном виде с НЧ. Пара свинец/НЧ TiO₂ в этом отношении занимает промежуточное положение. В случае адсорбции кадмия на НЧ трех видов уравнение изотермы адсорбции Ленгмюра не выполняется (зависимость между величинами, обратными адсорбции и равновесной концентрации не аппроксимируется удовлетворительным образом уравнением линейной регрессии и в большей степени соответствует, по-видимому, гиперболической зависимости). Ввиду этого, в отношении кадмия константы b и A_{max} не могут

быть корректно определены. Причина этого, по-видимому, состоит в том, что процесс связывания ионов кадмия на изученных видах НЧ не подчиняется модели однослойной, полностью обратимой адсорбции. Возможно, что вследствие различия в строении внешних электронных оболочек ионов свинца и кадмия связывание последних на поверхности НЧ является необратимым, т.е. сопровождается формированием более прочных, чем электростатическое взаимодействие, химических связей (например, донорно-акцепторных). Кроме того, не исключено, что адсорбция кадмия на НЧ является, в отличие от свинца, многослойной. Эти обстоятельства также могут создавать условия для переноса дополнительных количеств кадмия в форме, связанной с НЧ, через кишечный барьер.

Полученные данные согласуются с результатами экспериментов *in vivo*:

- при совместном введении свинца и НЧ TiO_2 отсутствовали достоверные изменения в накоплении свинца в печени крыс. При этом в остальных органах (почках, селезенке, семенниках и головном мозге) содержание свинца было ниже, чем у животных контрольной группы. Одновременно наблюдалось увеличение токсичности свинца, которое характеризовалось снижением концентрации Hb , количества лимфоцитов и тромбоцитов в крови и увеличением активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови и количества гепатоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза (исследования проведены совместно с к.м.н. Хорхе С.С., к.м.н. Трушиной Э.Н., к.м.н. Мустафиной О.К.), но не столь выраженные, как при совместном введении свинца и НЧ Al_2O_3 . Эти данные согласуются с результатами, полученными нами в эксперименте *in vitro* и показывают, что при совместном поступлении свинца и НЧ TiO_2 в изученных дозах имеет место некоторое увеличение токсичности свинца;

- при изучении комбинированного действия свинца и НЧ Al_2O_3 наблюдалось многократное и достоверное увеличение накопления свинца с возрастанием дозы НЧ Al_2O_3 в печени крыс. Похожий эффект для селезенки являлся менее выраженным и выявлялся только при малой дозе НЧ. При этом имело место увеличение токсичности свинца, характеризующееся снижением концентрации Hb в крови, показателя гематокрита и среднего содержания Hb в эритроците, моноцитов при значительном увеличении содержания глюкозы в сыворотке крови, числа гепатоцитов на ранних стадиях апоптоза, некротических клеток и снижения числа живых клеток (исследования проведены совместно с к.м.н. Хорхе С.С., к.м.н. Трушиной Э.Н., к.м.н. Мустафиной О.К.). Влияние НЧ на показатель гематокрита, содержание глюкозы в сыворотке крови, некротических и живых гепатоцитов подтверждалось данными факторного анализа ($p < 0,05$, ANOVA по фактору наличия НЧ Al_2O_3);

- при совместном введении свинца и НЧ SiO_2 в обеих дозах не происходило увеличения накопления свинца во всех изученных органах. Более того, полученные данные свидетельствовали о снижении проявления токсического действия свинца при его совместном поступлении с НЧ SiO_2 : снижалась активность щелочной фосфатазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови, увеличивалась концентрация Hb крови, эритроцитов и показатель гематокрита.

В процессе выполнения настоящей работы были получены данные, в ряде случаев характеризующие разнонаправленное изменение токсичности модельных токсикантов при их совместном поступлении с различными видами НМ. Это можно объяснить, в частности, тем, что НМ, имея обширную площадь поверхности и повышенную, в сравнении с материалами обычной степени дисперсности, каталитическую, реакционную активность, характеризуются различной сорбционной способностью.

В связи с этим разработаны методические подходы к проведению токсикологических исследований при совместном поступлении НМ и контаминантов и оценки их результатов, необходимых для последующего регламентирования НМ в пищевой продукции, которые сформулированы в МР 1.2.0054-11 «Порядок и методы оценки воздействия искусственных наночастиц и наноматериалов на токсическое действие химических веществ» и МУ 1.2.2965-11 «Порядок медико-биологической оценки действия наноматериалов на лабораторных животных по морфологическим признакам и метаболическим параметрам», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые доказано, что искусственные наноматериалы (наночастицы и фуллеренол) при совместном пероральном введении с такими токсичными элементами, как свинец и кадмий, в значительной степени влияют на процессы их бионакопления и некоторые показатели токсического действия.
2. Доказано, что поступление наночастиц диоксида кремния в дозах 1 и 100 мг/кг м.т. совместно со свинцом не приводит к увеличению его накопления во внутренних органах экспериментальных животных и сопровождается увеличением концентрации гемоглобина в крови ($p < 0,05$) и снижением экскреции 5-аминолевулиновой кислоты с мочой ($p < 0,05$), что свидетельствует о снижении проявления токсического действия свинца. Впервые установлено, что введение наночастиц диоксида кремния в дозах 1-100 мг/кг м.т. совместно со свинцом изменяет органное перераспределение элементов, характеризующееся достоверным увеличением содержания цинка, меди и марганца в печени, но не влияет на их содержание в почках и головном мозге.
3. Установлено, что поступление наночастиц оксида алюминия в дозе 100 мг/кг м.т. совместно со свинцом повышает накопление свинца в печени крыс на 84% ($p < 0,05$) при одновременном статистически достоверном снижении концентрации гемоглобина в крови и увеличении экскреции с мочой 5-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена (на 25% и 12% соответственно), что указывает на усиление токсического действия свинца.
4. Введение наночастиц диоксида титана в дозе 100 мг/кг м.т. совместно со свинцом достоверно уменьшает содержание свинца в почках (в 2 раза), семенниках (в 4,8 раза) и головном мозге (в 1,6 раза) при одновременном достоверном снижении концентрации гемоглобина в крови, что указывает на

независимость эффектов влияния данных наночастиц на токсическое действие и на бионакопление свинца.

5. Введение наночастиц диоксида кремния, наночастиц диоксида титана и фуллеренола совместно с кадмием влияет на биораспределение эндогенных элементов в органах: наночастицы диоксида кремния приводят к дозозависимому увеличению содержания кадмия в печени и к достоверному увеличению содержания мышьяка и цинка в печени, свинца, никеля и марганца – в почках и меди – в головном мозге. Под действием фуллеренола достоверно повышается содержания марганца и меди в печени и мышьяка в почках. Наночастицы диоксида титана не оказывают достоверных изменений на элементный состав внутренних органов.
6. Установлено, что в системе *in vitro* максимальная адсорбция свинца на трех видах наночастиц различается незначительно. В то же время прочность связывания ионов свинца с наночастицами диоксида кремния была наибольшей, с наночастицами оксида алюминия – наименьшей, а пара свинец/наночастицы диоксида титана занимала промежуточное положение, что качественно согласуется с данными, полученными в экспериментах *in vivo*.
7. Полученные результаты указывают на необходимость гигиенического нормирования совместно присутствующих наноматериалов и токсичных элементов в потребительской продукции (включая пищевые продукты) и объектах окружающей среды с учетом выявленных особенностей взаимодействия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

в журналах, рекомендованных ВАК

1. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Влияние наночастиц диоксида титана и диоксида кремния на накопление и токсичность свинца в эксперименте при их внутрижелудочном введении // Вопросы питания. – 2014. - Т.83, № 2. – С.57-63.
2. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсичность свинца при его совместном введении с наноструктурным диоксидом кремния // Вопросы питания. – 2015. – Т.84, № 2. – С. 10-18.
3. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсичность свинца при его совместном введении с наночастицами оксида алюминия крысам // Вопросы питания. – 2015. – Т.84, № 3. – С. 40-49.
4. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Сото С.Х., Мальцев Г.Ю., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсичность кадмия при его совместном введении с диоксидом титана (рутил), наноструктурным диоксидом кремния и фуллеренолом // Профилактическая и клиническая

медицина. – 2015. – Т.1, №54. – С.86-93.

5. Шумакова А.А. Изучение возможности адсорбции ионов тяжелых металлов на наночастицах // Здоровье населения и среда обитания- ЗНиСО. – 2018. – №11 (308) – С. 46-49.

в других изданиях

1. AA Shumakova, IV Gmshinski, SA Khotimchenko and EN Trushina. Interaction of engineered nanoparticles with toxic and essential elements // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 98 (2015) 012043 doi:10.1088/1757-899X/98/1/012043.

в материалах научных конференций

1. Шумакова А.А., Распопов Р.В., Арианова Е.А. Влияние введения рутила на хроническую интоксикацию свинцом // Вопросы диетологии. – 2011. – Т.1, №2. – С. 100-101 (Материалы XIII Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Персонифицированная диетология: настоящее и будущее», 5-7 декабря 2011 г., Москва).
2. Шумакова А.А. Изучение эффектов усиления проницаемости барьеров организма и изменения токсичности химических веществ под воздействием наночастиц диоксида титана и оксида кремния // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» с международным участием, 27-28 сентября 2012 г., Москва, С.349-350.
3. Шумакова А.А. Изучение влияния наночастиц оксида алюминия на токсическое действие свинца // Материалы Пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды Российской Федерации «Научно-методологические и законодательные основы совершенствования нормативно-правовой базы профилактического здравоохранения: проблемы и пути их решения», 13-14 декабря 2012 г., Москва, С. 493-495.
4. Antonina A Shumakova, Ivan V Gmshinsky, Sergey A Khotimchenko. Influence of oxide nanoparticles on accumulation and toxicity of lead in experiments with intragastric co-adminictration // 7th International Nanotoxicology Congress «Nanotox 2014» – Antalya-Turkey, April 23-26, 2014. Program & abstracts. – 2014. – P.51.
5. Шумакова А.А. Содержание свинца в печени, почках, головном мозге и некоторые показатели токсического действия свинца при сочетанном воздействии с наночастицами диоксида кремния // Вопросы питания. – 2014. – Т.83, №3 (Приложение). – С.268-269 (Материалы XV Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Здоровое питание: от фундаментальных исследований к инновационным технологиям», 2-4 июня 2014 г., Москва).
6. Шумакова А.А., Шипелин В.А. Сравнительная характеристика токсичности

Pb и Cd на организм лабораторных животных при их совместном введении с наноматериалами // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» под ред. д.м.н., проф. А.Ю. Поповой, 1-3 ноября 2016 г., Москва, С.251-252.

7. Шумакова А.А. Определение адсорбционной способности наночастиц SiO₂, TiO₂ и Al₂O₃ по отношению к ионам свинца и кадмия // Вопросы питания. – 2018. – Т.87, №5 (Приложение). – С. 204-205 (Материалы XVII Всероссийского конгресса с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Лечебное, профилактическое и спортивное питание», 29-31 октября 2018 г., Москва).