

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ,
БИОТЕХНОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Гмошинский Иван Всеволодович

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.....	4
НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ	6
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.....	7
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ	8
ЛИЧНЫЙ ВКЛАД СОИСКАТЕЛЯ.....	9
ОБЪЁМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.....	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВИНЦА И КАДМИЯ	11
1.2 ТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, ДИОКСИДА ТИТАНА, ОКСИДА АЛЮМИНИЯ И ФУЛЛЕРЕНОЛА В СИСТЕМАХ IN VITRO И IN VIVO	19
1.3 ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ И НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВ ТРАДИЦИОННОЙ СТЕПЕНИ ДИСПЕРСНОСТИ	41
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
2.1 ЖИВОТНЫЕ, СОСТАВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАЦИОНОВ	44
2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА ИСПОЛЪЗУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ	45
2.2.1 Наночастицы и наноматериалы	45
2.2.2 Токсиканты традиционной степени дисперсности	50
2.2.3 Прочие материалы и реактивы.....	50
2.3 СПИСОК ИСПОЛЪЗОВАННОГО ОБОРУДОВАНИЯ.....	51
2.4 СХЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ, ИСПОЛЪЗОВАННЫЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ.....	52
2.4.1 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц диоксида титана	52
2.4.2 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц диоксида кремния (220 м ² /г).....	53
2.4.3 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц диоксида кремния (300 м ² /г).....	54
2.4.4 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц оксида алюминия.....	55
2.4.5 Эксперимент по изучению совместного поступления кадмия и наноматериалов (наночастицы диоксида титана, диоксида кремния (300 м ² /г) и фуллерен)	56
2.5 МЕТОДЫ ОТБОРА СУБСТРАТОВ И ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ	57
2.6 АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	58
2.6.1 Спектрометрические методы	58
2.6.2 Динамическое рассеяние света.....	58
2.6.3 Атомно-абсорбционная спектрометрия.....	59
2.6.4 Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой	59
2.7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ АДСОРБЦИИ ИОНОВ СВИНЦА И КАДМИЯ НА НАНОЧАСТИЦАХ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ (300 м ² /г), ДИОКСИДА ТИТАНА И ОКСИДА АЛЮМИНИЯ.....	62
2.8 МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ.....	64
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	65
3.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА	65
3.1.1 Наночастицы диоксида титана	65
3.1.2 Наночастицы диоксида титана (220 м ² /г)	65

3.1.3 Наночастицы диоксида титана (300 м ² /г)	66
3.1.4 Наночастицы оксида алюминия	66
3.1.5 Фуллеренол	67
3.2 ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ СВИНЦА И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	68
3.2.1 Масса тела и внутренних органов	68
3.2.2 Содержание гемоглобина в крови	70
3.2.3 Содержание свинца во внутренних органах	72
3.3 ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ СВИНЦА И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ (220 м ² /Г)	74
3.3.1 Масса тела и внутренних органов	74
3.3.2 Содержание гемоглобина в крови	74
3.3.3 Экскреция 5-аминолевулиновой кислоты в моче	78
3.3.4 Содержание свинца во внутренних органах	79
3.4 ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ СВИНЦА И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ (300 м ² /Г)	81
3.4.1 Масса тела и внутренних органов	81
3.4.2 Содержание гемоглобина в крови	81
3.4.3 Экскреция 5-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена с мочой.....	84
3.4.4 Содержание свинца и ряда других элементов во внутренних органах	87
3.5 ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ СВИНЦА И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ	92
3.5.1 Масса тела и внутренних органов	92
3.5.2 Содержание гемоглобина в крови	97
3.5.3 Экскреция 5-аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена с мочой.....	97
3.5.4 Содержание свинца во внутренних органах	99
3.6 ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ КАДМИЯ И НАНОМАТЕРИАЛОВ (НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ТИТАНА, ДИОКСИДА КРЕМНИЯ (300 м ² /Г) И ФУЛЛЕРЕНОЛ)	101
3.6.1 Масса тела и внутренних органов	101
3.6.2 Влияние наноматериалов на содержание кадмия и других элементов во внутренних органах.....	105
3.7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ АДсорбЦИИ ИОНОВ СВИНЦА И КАДМИЯ НА НАНОЧАСТИЦАХ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ (300 м ² /Г), ДИОКСИДА ТИТАНА И ОКСИДА АЛЮМИНИЯ.....	114
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
5 ВЫВОДЫ.....	136
6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	138
7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Наночастицы (НЧ) и наноматериалы искусственного происхождения рассматриваются как фактор, способный оказывать неоднозначное, в том числе, токсическое воздействие на организм человека и объекты окружающей среды [43; 44]. По многим своим свойствам НЧ и наноматериалы 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 [201]. При этом НЧ могут подвергаться процессам биоассимиляции и биотрансформации, включая их растворение, образование и диссоциацию поверхностных адсорбционных слоёв белков и других макромолекул, образование вторичных НЧ [67]. Вследствие этого комплекса факторов, НЧ и другие нанообъекты (нанотрубки, нановолокна, нанопластины и др.) должны рассматриваться как особая форма вещества с уникальными для неё биологическими и токсикологическими характеристиками. 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 [29; 30], 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 [31].

В процессе оценки риска наночастиц и наноматериалов, поступающих из окружающей среды, следует иметь в виду, что в большом числе важных случаев они воздействуют на организм человека не изолированно, а совместно с другими контаминантами, в том числе с ионами токсичных элементов. При этом, исходя из общих представлений о физико-химических свойствах НЧ и наноматериалов, можно ожидать взаимодействия этих принципиально

различающихся опасных факторов, включая адсорбцию ионов тяжёлых металлов на НЧ, их совместный транспорт через биологические барьеры, биораспределение 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 изучено недостаточно. Согласно отдельным данным, представленным в мировой научной литературе [250; 251], 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 [67].

В числе контаминантов, представляющих интерес с позиции исследования их возможного взаимодействия с НЧ и наноматериалами, наибольшее значение имеют ионы свинца (Pb^{2+}) и кадмия (Cd^{2+}). 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) [121] и предположительно канцерогенных (кадмий) свойств, широкого распространения в окружающей среде, способности передаваться по трофическим цепям в биосфере и контаминировать пищевую продукцию. Согласно официальным международным документам ФАО-ВОЗ [112] и российской нормативной базе [42] указанные элементы 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 быть представлены в составе пищевых продуктов, куда они могут поступать в качестве контаминантов, содержащихся в отходах промышленных предприятий, либо вводиться преднамеренно, со специальными технологическими целями, например, в роли пищевых добавок (в настоящее время это НЧ диоксида кремния, в перспективе - НЧ диоксида титана, фуллеренов и фуллеренолов, серебра и другие). Совместное присутствие НЧ и ионов 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 практически не исследованы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось изучение в эксперименте влияния наночастиц и наноматериалов на токсическое действие и бионакопление токсичных элементов, являющихся приоритетными контаминантами пищевых продуктов.

В **задачи** работы входило:

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.

В качестве **объектов** исследования были выбраны: лабораторные животные (крысы самцы линии Вистар); искусственные наноматериалы (НЧ диоксида титана в рутильной форме, НЧ диоксида кремния с удельной площадью поверхности 220 и 300 м²/г, НЧ оксида алюминия, фуллеренол С₆₀(ОН)₂₄); растворимые соли двухвалентных свинца и кадмия; сбалансированные по содержанию основных пищевых веществ экспериментальные рационы; биологический материал (кровь, моча, органы и ткани) от животных, подвергнутых сочетанному действию ионов тяжелых металлов и наноматериалов.

Применяемые **методы** исследования включают физико-химические (динамическое рассеяние света), химико-аналитические (атомно-абсорбционная спектрофотометрия, масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой), токсикологические, биохимические методы.

Научная новизна работы

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

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 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

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены 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» (г. Москва, 2018).

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, входящем в систему баз данных Scopus, 7 тезисов в трудах российских и международных научных конференций.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя составлял не менее 80% и заключался в сборе и анализе научной литературы по теме исследования, разработке дизайна биологического эксперимента, отборе тестируемых образцов наноматериалов и их характеристике методом динамического рассеяния света, проведении подострых токсикологических исследований на лабораторных животных с введением наноматериалов и солей токсичных металлов, 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.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из разделов «введение», «обзор литературы», основной части, включающей разделы «материалы и методы исследования», «результаты исследования»,

«обсуждение результатов», выводов, списка использованных источников. Список литературы содержит 300 источников, из них 55 на русском и 245 на иностранном языке. Объем работы составляет 162 страницы машинописного текста, содержит 14 рисунков и 51 таблицу.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Токсикологическая характеристика свинца и кадмия

В настоящее время приоритетное значение с позиций токсикологии среди токсичных элементов (ТЭ) имеют свинец, ртуть и кадмий, а также мышьяк (традиционно рассматриваемые в комплексе). Они обладают высокой токсичностью, способностью накапливаться в организме при длительном поступлении с пищевыми продуктами и обуславливать различные отдаленные последствия, в том числе мутагенные и канцерогенные [1; 22]. Возрастающая индустриализация крупных городов и мегаполисов в последние десятилетия ведет к значительному увеличению поступления ТЭ в окружающую среду [2; 19; 280]. Таким образом, вопрос о гигиеническом нормировании этих соединений в воде, атмосферном воздухе, а также пищевых продуктах, по-прежнему, остаётся актуальным.

Свинец

Свинец – химический элемент IV группы, главной подгруппы периодической системы Менделеева, атомный номер 82. Строение электронной оболочки $Xe6s^24f^{14}5d^{10}6p^2$. Состоит из смеси природных изотопов со следующими атомными массами (распространенность в природе, %): 204 г/моль (1,4), 206 г/моль (24,1), 207 г/моль (22,1) и 208 г/моль (52,4). В соединениях может проявлять степень окисления (СО) 0, + 2 и + 4. Кларк (содержание в земной коре, по А.Е.Фермсмону, 1933) - 1×10^{-4} атомных %. В природе представлен в виде ряда минералов, включая галенит (свинцовый блеск) - PbS , сурик - Pb_3O_4 и другие. По физическим свойствам - тяжёлый ($d = 11,3$ г/см³), мягкий металл светло-серого цвета. Температура плавления составляет 327°C, испарение свинца происходит при 400 - 500°C, точка кипения - 525°C. В биологической среде ионы Pb^{2+} образуют прочные связи с сульфгидрильными, карбоксильными и фосфатными группами минеральных и органических веществ [17].

Свинец и его соединения применяется в электронной промышленности в качестве припоев, сплавов; для защиты от радиоактивного излучения; при производстве автомобильных аккумуляторов, эмали, глазури, хрусталя, стекла, белил, красок, а также олифы, резины, спичек [7; 8; 26; 32; 36; 96].

В эпоху античности и в средние века бытовая интоксикация свинцом, протекающая в форме т.н. «сатурнизма», развивалась в связи с употреблением пищевых продуктов и вина, хранившихся в глиняной посуде, покрытой изнутри глазурью, содержащей свинец, воды из свинцовых водопроводных труб. В XX веке большое значение имело загрязнение окружающей среды свинцом, выделяющимся при сгорании моторных топлив, содержащих добавку тетраэтилсвинца $Pb(C_2H_5)_4$. В настоящее время свинец поступает в окружающую среду при сжигании каменного угля, нефти, газа, а также вследствие работы предприятий стекольной,

лакокрасочной, оборонной, машиностроительной и металлообрабатывающей отраслей промышленности [13; 37]. К «свинцовоопасным» профессиям относятся аккумуляторщики, составители шихты в производстве хрусталя, аппаратчики в производстве свинцовых пигментов, плавильщики свинца, а также декораторы, расписывающие посуду свинецсодержащими красками.

Глобальный альянс по отказу от применения свинца в красках, созданный на базе ВОЗ и Программы ООН по окружающей среде, активно ведет работу по содействию поэтапному прекращению производства и продажи красок, содержащих свинец, а также концентрирует внимание на усилиях по достижению международной цели – предотвращения случаев попадания свинца из красок в организм детей и сведения до минимума воздействия свинца в красках на рабочем месте [294].

Свинец является одним из наиболее токсичных металлов, а загрязнение окружающей среды им и его соединениями признается приоритетной проблемой экологии и охраны здоровья населения [24; 259]. По данным ВОЗ свинец является классическим политропным ядом [230]. Средняя летальная доза LD₅₀ для лабораторных животных при внутрижелудочном поступлении для разных солей свинца (ацетат свинца, хлорат свинца, нитрат свинца, олеат свинца, оксид свинца и сульфат свинца) составляет от 300 до 4000 мг/кг массы тела [112].

Токсическая доза свинца для человека – 1 мг, летальная доза – 10 г. Данные о типичном содержании свинца в органах, тканях и экскретах организма человека приведены в Таблице 1 [40].

Таблица 1 – Характеристики бионакопления свинца в организме человека

	Среднее содержание:
Организм человека массой 70 кг	120 мг
Кости	3,6-250 мг/кг
Мышцы	0,23-3,3 мг/кг
Волосы	0,05-52 мг/кг
Зубы (эмаль)	7,3-23 мг/кг
Зубы (дентин)	3,6-36 мг/кг
Ногти	14-40 мг/кг
Печень	0,05-2,5 мг/кг
Грудное молоко	0,0036-0,03 мг/дм ³

Согласно данным изучения канцерогенных свойств свинца и его соединений, представленным в [140], неорганические формы свинца характеризуются как *возможный*

канцероген для людей (группа 2А). Для лабораторных животных свинец является абсолютным канцерогеном, вызывающим опухоли головного мозга и почек. Он также может являться «промоутером» опухоли почек совместно с другими канцерогенами [230].

Авторы работы [59] с помощью микроядерного теста подтверждают канцерогенные и генотоксические воздействия свинца на крыс самцов линии Вистар.

Согласно многочисленным экспериментальным данным свинец проявляет также тератогенные [226], мутагенные [1; 39] и генотоксические [119; 191] свойства.

Выделяют несколько путей поступления свинца в организм человека: перорально, ингаляционно [16], а также через кожные покровы. Основным путем поступления является пероральный. Всасывание происходит, главным образом, в тонкой кишке [8; 25] –от 5 до 10% введенного свинца [16; 218], причем у беременных женщин и детей его абсорбция может достигать 50% [19]. Степень всасываемости зависит от растворимости его соединений (нерастворимые соли– сульфаты, сульфиды, хроматы– обладают низкой абсорбционной способностью, в то время как растворимые– ацетат, нитрат- всасываются сильнее), состава пищи [98], времени года.

В частности, по результатам ретроспективного анализа данных по изучению зависимости всасывания радиоактивно меченого свинца в изолированной петле тонкой кишки крыс самцов линии Вистар от времени года авторы работы [66] обнаружили, что в зимний (декабрь, январь, февраль) и весенний (март, апрель, май) периоды всасывание свинца оказывается ниже по сравнению с летним (июнь, июль, август) и осенним (сентябрь, октябрь, ноябрь) периодами. При этом было проведено 36 экспериментов на протяжении 6 лет с использованием в общей сложности 305 животных массой 200-250 г; доза вводимого радиоактивно меченого свинца составляла 1 мкг. Абсорбцию свинца измеряли через 4 часа после введения с использованием метода гамма-спектрометрии всего тела животного.

Сведения о токсикокинетике свинца в организме человека в настоящее время противоречивы. Одни авторы выделяют три основных метаболических пула этого элемента в организме [22]: кроветворная система (самый короткий период полувыведения, приблизительно 30-40 дней [230]), мягкие ткани, включая скелетные мышцы (средний период полувыведения – несколько недель) и скелет (очень длительный период полувыведения – 10-30 лет [113]), другие [16] – два: кровь (быстрый пул) и скелет (медленный пул). По скорости десорбции свинец скелета разделяют на две субфракции: лабильную, быстро обменивающуюся с кровью, и инертную. При определенных условиях (беременность, кормление грудью, остеопороз и хронические заболевания) инертная часть свинца, содержащаяся в скелете, может мобилизоваться и переходить в кровь [16; 217].

Данные о путях выведения свинца из организма также не совпадают у разных авторов. Королев А.А. [22], Z. Gregus с соавторами [129], N. Ishihara с соавторами [139], Р.Д. Габович, Л.С. Припутина [90], а также Л.И. Кузубова с соавторами [23] указывают, что для свинца характерно выведение исключительно с фекалиями (от 80 до 90%). В то же время, в 73rd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives «Evaluation of certain food additives and contaminants» утверждается, что основные пути выведения свинца из организма – это моча и фекалии [113]. По данным [22], меньшая часть свинца выводится из организма с мочой (клубочковая фильтрация и канальцевая экскреция), потом и грудным молоком.

Основной механизм токсического действия свинца заключается в энзимопатическом эффекте – ингибировании активности ферментов за счет связывания с функциональными группами их активных центров [22; 230; 266]. Это проявляется в нарушении биосинтеза гема и порфиринов, ферментов почек, печени, эритроцитов и других органов. При интоксикации свинцом происходит снижение активности таких ферментов, как Na^+ , K^+ -аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы), гемсинтазы, цинк-содержащего митохондриального фермента феррохелатазы (катализирует проникновение Fe^{2+} в протопорфириновое кольцо в процессе биосинтеза гема), митохондриальных ферментов синтазы 5-аминолевулиновой кислоты и дегидратазы 5-аминолевулиновой кислоты. Последняя по современным представлениям является наиболее чувствительным к действию свинца ферментом [39; 230]. Изменение активности дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты относят к наиболее ранним и достоверным показателям свинцовой интоксикации [76; 94; 180; 16; 23].

Альтернативное объяснение механизма свинцовой интоксикации приводится авторами работы [120], которые высказывают предположение о том, что нарушение в биосинтезе гема является следствием свинец-зависимого окислительного стресса.

При отравлении токсичными элементами выделяют различные симптомы, однако для каждого элемента существуют так называемые критические органы или системы органов, повреждение которых специфически связано с воздействием того или иного элемента. Для свинца одной из критических систем является центральная нервная система, поражение которой проявляется в нарушении когнитивных и моторных функций, изменении эмоциональной сферы, полиневритах, нарушении координации движений, а также в снижении коэффициента интеллекта IQ [99; 106; 126; 203; 248; 276]. Особенно сильно описанные воздействия проявляются у детей [196]. Также при свинцовой интоксикации наблюдаются дисфункции почек, печени [215], гипертензия [243], заболевания полости рта, у беременных – нарушение развития плода, вплоть до выкидышей [161; 205].

На величину всасывания свинца и, следовательно, интенсивность проявлений его токсического действия, влияют различные пищевые факторы. В частности, такие элементы, как кальций, железо, цинк, магний, фосфор, хром, селен, а также серосодержащие аминокислоты, витамины А, С, Е, группы В, фолиевая кислота, никотинамид и пищевые волокна уменьшают всасывание свинца в ЖКТ, тем самым снижая его общее содержание в организме, тогда как жирная пища, напротив, способствует увеличению всасывания [22].

Авторы ряда работ представляют данные о снижении токсического действия свинца и, в том числе, его кумуляции в органах в экспериментах *in vivo* при сочетанном введении с экстрактом бромелайна [60], силимарином и димеркаптоянтарной кислотой [58].

В качестве аналитических количественных методов определения свинца в биологических образцах и пищевых продуктах чаще всего используются атомно-абсорбционная спектроскопия [12; 13] и масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой [28].

Атомно-абсорбционный анализ (ААС)- это метод количественного элементного анализа по атомным спектрам поглощения (абсорбции). Исследование включает стадии подготовки проб методом сухой минерализации и анализа проб, вводимых в виде раствора в воздушно-ацетиленовое пламя, на атомно-абсорбционном спектрометре. Чувствительность метода составляет 100 нг/дм³.

Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) представляет собой современный аналитический метод, комбинирующий использование индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионов с квадрупольным масс-спектрометром, выступающим в роли масс-анализатора (фильтра) и дискретно-диодным детектором, который используется для регистрации отдельных ионов и их потоков. Чувствительность метода составляет 1 нг/дм³.

В большинстве случаев для количественного определения свинца в организме в качестве биосубстрата используют кровь. Концентрация свинца в цельной крови человека в норме составляет не более 40 мкг/100 см³ (для мужчин) и не более 30 мкг/100 см³ цельной крови (для женщин) [113]. Клинические признаки свинец-зависимой анемии развиваются при концентрации свинца в цельной крови более 50 мкг/100 см³ [230].

Условно переносимое недельное поступление (УПНП) свинца, ранее установленное на уровне 25 мкг/кг массы тела для всех групп населения [113], в настоящее время отозвано ВОЗ с целью дальнейшего уточнения норматива. Поступление свинца в составе рациона человека составляет в разных странах от 0,02 до 3,0 мкг/кг массы тела [113], с питьевой водой – 0,1 мг/дм³, или 200 мкг/день на человека [143].

В настоящее время в рамках действующего Технического Регламента Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» на отдельные группы пищевой

продукции распространяются следующие нормативы по содержанию свинца (мг/кг, не более): мясо и мясопродукты, птица, яйца и продукты их переработки - 0,3 – 1,0; молоко и молочные продукты - 0,1 – 10,0; рыба, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них - 0,5 – 10,0; продукты для питания беременных и кормящих женщин - 0,02 – 0,3; продукты детского питания - 0,02 – 1,0.

Кадмий

Кадмий (Cd)– химический элемент II группы побочной подгруппы периодической системы Менделеева, атомный номер 48. Строение электронной оболочки $Kr5s^24d^{10}$. Состоит из смеси природных изотопов со следующими атомными массами (распространенность в природе, %): 106 г/моль (1,25), 108 г/моль (0,89), 110 г/моль (12,49), 111 г/моль (12,80), 112 г/моль (24,13), 113 г/моль (12,22), 114 г/моль (28,73), 116 г/моль (7,49). По физико-химическим свойствам представляет собой мягкий, ковкий, тягучий, белый, блестящий металл [3; 36], окисляющийся на воздухе с образованием тонкой окисной пленки на поверхности. Температура плавления составляет – 321°C, точка кипения – 766,5°C.

Кларк (содержание в земной коре, по А.Е.Фермсмону, 1933) - 8×10^{-5} атомных %. В природе присутствует обычно в виде рассеянной примеси к минералам цинка. Редкими минералами, содержащими кадмий в концентрированном виде, являются гринокит CdS , отавит $CdCO_3$, монтемпонит CdO и кадмоселит $CdSe$. В соединениях может проявлять степень окисления 0 и +2.

Для кадмия характерно образование высокопрочных соединений с серой тиоловых групп органических соединений, в особенности, белков и ферментов.

Кадмий применяется для изготовления защитных покрытий металлических изделий (кадмий более коррозионностоек, чем цинк и никель), сплавов, кадмиево-никелевых аккумуляторов, в атомной энергетике (изготовление регулирующих стержней для ядерных реакторов), в производстве солнечных батарей [92], полупроводниковых материалов, квантовых точек, используемых в биологии и медицине в качестве флуоресцентных меток, а также в изделиях фотоники. Поступление кадмия в окружающую среду связано, главным образом, с работой сталелитейных заводов [22] (цветная металлургия дает 5 тысяч тонн выбросов кадмия в год [27]), сжиганием отходов (1,5 тысячи тонн в год), производством фосфорных удобрением и сжиганием дерева (по 0,2 тысячи тонн в год). При деятельности вулканов выделяется в окружающую среду 0,52 тысячи тонн кадмия в год, выделения растений составляют 0,2 тысячи тонн [27].

Средняя летальная доза кадмия LD_{50} для лабораторных животных при внутрижелудочном поступлении составляет от 100 до 300 мг/кг массы тела и зависит от типа вводимого соединения [113].

Данные о длительном воздействии кадмия на организм говорят о его канцерогенном [70], тератогенном [95] эффектах, влиянии на функцию почек [1; 16], репродуктивной системы [95], нейротоксичности [286], генотоксичности [80; 148; 125; 204; 212; 270] и цитотоксичности [148; 204].

Данные о типичном содержании кадмия в органах, тканях и экскретах организма человека приведены в таблице 2 [40].

Токсическая доза кадмия для человека составляет 3-330 мг, летальная доза – 1,5-9 г.

Таблица 2 – Характеристики бионакопления кадмия в организме человека

	Среднее содержание:
Организм человека массой 70 кг	50 мг
Кости	1,8 мг/кг
Мышцы	0,23-3,3 мг/кг
Волосы	0,35-2,43 мг/кг
Зубы (эмаль)	0,1-0,12 мг/кг
Зубы (дентин)	<0,0001-0,51 мг/кг
Ногти	0,08-3,4 мг/кг
Печень	0,3-4,1 мг/кг
Грудное молоко	0,00007-0,0046 мг/дм ³

Выделяют несколько путей поступления кадмия в организм человека: во-первых, с дымом сигарет [56; 145], во-вторых, из воздуха, особенно городского [86] и, в-третьих, с пищевыми продуктами. Более 90% всего кадмия поступает к человеку с пищей. По данным [27], наиболее высокие уровни содержания Cd – в зерне, листьях и корнях растений. Согласно материалам ВОЗ [113], среди пищевых продуктов наибольшее количество кадмия (от 0,1 до 4,8 мг/кг) содержится в овощах (в том числе сухих), мясе и субпродуктах, морепродуктах, моллюсках и устрицах [76], орехах, растительных маслах, кофе, чае, какао и специях. Потребление соевого творога тофу может увеличивать содержание кадмия в организме на 22% [245].

Всасывание кадмия в желудочно-кишечном тракте достаточно низкое: у лабораторных животных (крысы, мыши) оно составляет от 0,5 до 3,0%, у человека – от 1 до 10% и зависит от

типа соединения, дозы, частоты экспозиции, возраста и взаимодействия с другими компонентами рациона [113].

Основное количество кадмия из организма выводится с мочой и калом. Период полувыведения составляет от 200 до 700 дней у лабораторных животных (крысы, мыши), у людей – от 10 до 33 лет (из почек) и от 4 до 19 лет (из печени).

По своему ионному радиусу и заряду ион Cd^{2+} близок к иону Ca^{2+} , поэтому при поступлении кадмия в организм происходит изоморфное замещение им кальция в костной ткани, что ведет к деминерализации костной ткани [176]. По электронной конфигурации и сродству к органическим лигандам ион кадмия напоминает ион цинка и может замещать последний в металлоферментах. Такие белки, как металлотионеины, обладающие большим количеством SH-групп (т.е. центров замещения) играют роль «переносчиков» двухвалентных ионов переходных металлов, в частности кадмия, внутрь клетки [41].

Основным биомаркером, используемым при оценке кадмиевой интоксикации, является β 2-микроглобулин, который определяют в моче [40]. В качестве общепринятых биосубстратов для определения кадмия используют мочу и цельную кровь, в качестве возможных – волосы [41].

Кадмий является элементом, который практически отсутствует в организме при рождении и накапливается с годами. Органами-мишенями для поступающего через желудочно-кишечный тракт кадмия являются почки (50%) и печень (15%), в то время как для вдыхаемого – легкие и почки. Около 20% кадмия обнаруживается в мышцах.

По данным ВОЗ [113] концентрация кадмия в цельной крови человека в норме не превышает 0,5 мкг/100 см³.

Наиболее важную роль в абсорбции кадмия в желудочно-кишечном тракте играет потребление железа. При недостаточном поступлении железа с рационом питания абсорбция кадмия увеличивается на 1-5% у мужчин и до 10% у женщин. На биодоступность кадмия оказывает также влияние уровень поступления с рационом кальция, цинка, белка и пищевых волокон [22; 265].

В качестве аналитических количественных методов определения кадмия в пищевых продуктах, воде и биологических образцах чаще всего используется пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия [12; 13], электротермическая атомно-абсорбционная спектрометрия, непламенная атомно-абсорбционная спектрометрия с графитовой кюветой и гидридной генерацией, атомно-флуоресцентная спектроскопия, эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой и масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой [28].

Условно переносимое недельное поступление кадмия установлено на уровне 7 мкг/кг массы тела [113], но, учитывая его весьма длительный период полувыведения, предпочтительнее использовать условно переносимое месячное поступление – 25 мкг/кг массы тела [113].

В настоящее время в рамках действующего Технического Регламента Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» на некоторые группы пищевой продукции действуют следующие нормативы по содержанию кадмия (мг/кг, не более): мясо и мясопродукты, птица, яйца и продукты их переработки – 0,01 – 1,0; молоко и молочные продукты - 0,03 – 0,2; рыба, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них - 0,2 – 2,0; продукты для питания беременных и кормящих женщин - 0,02 – 0,06; продукты детского питания - 0,02 – 0,1.

1.2 Токсичность наночастиц диоксида кремния, диоксида титана, оксида алюминия и фуллеренола в системах *in vitro* и *in vivo*

Наночастицы диоксида кремния

С каждым годом в мире растет оборот продукции, содержащей НМ, в частности НЧ SiO₂, которые применяются в упаковке пищевых продуктов [9], производстве пищевых добавок [240], фармацевтических и медико-диагностических препаратов [183]. В связи с этим оценка их возможного токсического действия, а также оценка риска от применения содержащей их потребительской продукции представляет огромный интерес.

По данным авторов работы [109] НЧ SiO₂ вызывают окислительный стресс в клетках бронхиального эпителия человека линии Beas-2B, поскольку в их присутствии отмечается значительное увеличение уровня реакционноспособных соединений кислорода (РСК), а также индукция гемоксигиназы-1 посредством сигнального пути белка Nrf-2-ERK - MAP киназы. То, что в основе негативных эффектов НЧ SiO₂ может лежать каталитическая генерация РСК, подтверждается данными экспериментов в бесклеточной системе [258], в культуре кератиноцитов [192] и альвеолярных эпителиоцитов человека [109].

По результатам исследования [296], проведенного на зародышевых клетках почек человека линии НЕК293, для НЧ аморфного SiO₂ не отмечается выраженных проявлений генотоксических эффектов, вовлеченных в процессы канцерогенеза. Тем не менее, при концентрации этих наночастиц на уровне 120 мг/см³ наблюдали изменение уровней экспрессии отдельных генов.

Цитотоксические эффекты НЧ SiO₂ для клеток линии ЕАНУ926 были выявлены в исследовании [194]. При этом частицы субмикронного размера (100-330 нм) не были токсичны.

В культуре стволовых клеток эмбриона мыши НЧ аморфного SiO₂ диаметром 10 и 30 нм (но не 80 нм) подавляли дифференцировку этих клеток в нормальные кардиомиоциты [209]. В культуре эпителиоцитов бронхов Beas-2В НЧ силики активно захватывались клетками, проникали в ядро и вызывали повреждение ДНК по данным комет-теста (щелочного электрофореза) [273]. Эти эффекты в значительной мере зависели от размера частиц и практически уже не проявлялись у частиц микронного размера.

Апоптоз и изменения в экспрессии его регуляторов p53 и Bax/Bcl-2 под действием НЧ SiO₂ размером 21 нм были выявлены в нормальных клетках печени линии L-02 [288]. На наличие у НЧ SiO₂ цитотоксических свойств указывают также данные работ [110; 283; 287].

Таким образом, данные ряда исследований *in vitro* на моделях клеточных культур показали наличие у НЧ аморфного SiO₂ цитотоксического действия. Его механизм, скорее всего, является неспецифическим в том отношении, что он не связан с действием кремния как химического элемента на те или иные биохимические механизмы клетки, а обусловлен, скорее всего, процессами каталитической генерации РСК на межфазной границе SiO₂-вода. Известные противоречия в оценке этого эффекта в разных работах в отношении его связи с размером, формой, способом получения НЧ могут быть связаны с пробелами в физико-химической характеристике исследуемых НМ. В частности, не во всех работах было соблюдено такое обязательное требование к НМ, применяемым в *in vitro* тестах, как отсутствие контаминации бактериальным эндотоксином (липополисахаридом) [111].

Обсуждая возможные механизмы воздействия НЧ SiO₂ на клетки иммунной системы *in vivo*, следует упомянуть, что в литературе имеются свидетельства неблагоприятного воздействия этого НМ на иммунологические и гематологические показатели. В их числе – усиление продукции провоспалительных цитокинов [150], агрегация тромбоцитов [88], гемолиз [169]. При введении НЧ SiO₂ крысам внутрибрюшинно отмечены сдвиги в функции перитонеальных макрофагов, экспрессии генов IL-1,6, TNF-α, синтазы оксида азота, циклооксигеназы-2, а также повышение продукции IL-1β, TNF-α, NO, [208].

Авторы исследования [293] изучали острую токсичность НЧ SiO₂, вводимых внутривенно мышам в дозах 29,5, 103,5 и 177,5 мг/кг массы тела. Методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) определяли содержание кремния в печени, селезенке и легких. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) показала наличие небольшого количества НЧ в гепатоцитах печени и в капиллярных эндотелиальных клетках легких и почек. При гистологических исследованиях была выявлена лимфоцитарная инфильтрация, образование гранулемы, дегенерация гепатоцитов печени, гиперплазия мегакариоцитов в селезенке, пневмония и утолщение стенок легких во всех опытных группах.

Результаты данного исследования подтверждают способность НЧ SiO₂ вызывать повреждения печени, селезенки и легких.

Авторы работы [197] обращают внимание на обнаруженный гепатотоксический эффект НЧ SiO₂ с размером частиц 70 нм, вводимых внутривенно дважды в неделю на протяжении 4 недель в дозе 10 мг/кг массы тела. При этом отмечалось также достоверное повышение уровней сывороточных маркеров повреждения печени, таких, как аминотрансферазы, и противовоспалительных цитокинов сыворотки. Используемые в данной работе микрочастицы SiO₂ с диаметром 300 и 1000 нм не показали каких-либо воздействий даже при дозе 100 мг/кг массы тела.

Ингаляционная токсичность *in vivo* НЧ SiO₂ была подтверждена результатами работ [170; 208; 209; 225; 234]. Так, в работе [225] ингаляция НЧ SiO₂ мышам вызывала у них легочный нейтрофилез, сопровождаемый повышенной экспрессией TNF- α и нейтрофил-привлекающего хемокина CXCL1 в легочной ткани.

В работе [162] изучали токсичность трех видов НЧ SiO₂ с различным отношением максимального поперечного размера к минимальному (*aspect ratios*): 1, 1,75 и 5 после внутрижелудочного введения. По мере увеличения *aspect ratios* наблюдалось снижение биodeградации, абсорбции и экскреции НЧ, а также снижение их накопления в печени и выведения с мочой.

Подострая (в 84-х дневном эксперименте) токсичность двух видов НЧ SiO₂ при пероральном введении крысам в очень высоких дозах (100-2500 мг/кг массы тела ежедневно) была оценена в исследовании [246]. При этом отмечали дозозависимое усиление фиброза в печени и экспрессию генов, ответственных за этот процесс. Пороговая токсическая доза (LOAEL) НЧ SiO₂ при подострой пероральной экспозиции составила по этим показателям 2500 мг/кг массы тела. Отсутствие наблюдаемых эффектов при меньших дозах вводимого НМ может быть связано с ограниченным числом и недостаточной чувствительностью изученных в данной работе биомаркеров, что отмечается самими авторами статьи.

В ряде других публикаций при изучении воздействия НЧ SiO₂ в краткосрочных экспериментах были выявлены такие эффекты, как незначительное увеличение числа микроядерных клеток в толстой кишке крыс (при дозе 5 мг/кг массы тела в день), гепатотоксичность, тромбоцитопения [61; 131; 153; 255].

Предметом исследований значительного числа работ в системах *in vitro* и *in vivo* являются отдаленные неблагоприятные эффекты действия НЧ SiO₂ на биологические объекты, в частности, генотоксичность, иммунотоксичность и аллегенность.

В работе [130] сравнивали цитотоксичность и генотоксичность пяти образцов НЧ SiO₂ промышленного производства на клетках фибропластов хомячков (V79), которые обрабатывали суспензиями частиц, разведенными бычим сывороточным альбумином. Показано, что пирогенный и осажденный образцы НЧ SiO₂ с размерами частиц 20 нм, и коллоидный образец с размером частиц 15 нм достоверно снижали клеточную активность через 24 часа экспозиции, в то время как для пирогенного образца с размером частиц 20/75 нм и коллоидного образца с размером частиц 40/80 этот эффект был пренебрежимо малым. Ни один из представленных образцов не показал образование микроядер или геномных мутаций в клетках. Интересно отметить, что пирогенные, осажденные и коллоидные образцы НЧ SiO₂ с размером частиц около 20 нм показали большую цито- и генотоксичность в клетках V79, в отличие от аналогичных образцов с размером частиц около 50 нм, несмотря на то, что процесс производства был идентичным.

Как сообщают авторы работы [256], наблюдаемые генотоксические эффекты коллоидных НЧ SiO₂ размером 15 и 55 нм на эпителий кишечника могут быть опосредованы окислительным стрессом, а не непосредственным взаимодействием с ДНК. Это может свидетельствовать о потенциальных неблагоприятных эффектах в отношении эпителия кишечника в естественных условиях.

В исследовании [104] высказано предположение о том, что НЧ SiO₂ инициируют вторичные генотоксические эффекты посредством привлечения клеток воспаления подобно тому, как это описано для кристаллического диоксида кремния (кварц). В своей работе авторы не выявили каких-либо генотоксических эффектов на низких дозах НЧ SiO₂, в то время как на высоких в системе *in vitro* на эпителиальных клетках человека HT-29 наблюдалось [237] увеличение в степени повреждения ДНК и образование микроядерных ретикулоцитов.

В работе [179] показано, что коллоидные аморфные НЧ SiO₂ с разным размером частиц (9, 15, 30 и 55 нм) могут усиливать генотоксические эффекты в клетках легких *in vitro* в сравнительно высоких концентрациях. Однако, эти же НЧ SiO₂ не показывали усиления генотоксического действия на легкие крыс даже при выраженном воспалении.

НЧ SiO₂ были способны усиливать интраназальную аллергическую сенсibilизацию мышей овалбумином (ОВА) [291]. Сходные данные были получены на модели бронхиальной астмы у крыс, вызываемой сенсibilизацией к ОВА, в исследовании [134].

Попытки количественно оценить всасывание и бионакопление SiO₂ в органах и тканях крыс методом химического анализа (с использованием ИСП-МС) приводят к неоднозначным результатам ввиду высокого фонового уровня кремния в органах животных контрольной группы. На качественном уровне было констатировано достоверное увеличение содержания

кремния в печени и селезенке животных, получавших НЧ SiO₂ в дозах более 1000 мг/кг массы тела [268].

В исследованиях [47; 48; 49; 54] была проведена оценка *in vivo* токсичности наноразмерного аморфного (пирогенного) SiO₂ типа «Аэросил» в подостром эксперименте на крысах длительностью 92 суток. НМ, предварительно охарактеризованный методами ТЭМ, АСМ, динамического рассеяния света и спектроакустики, вводили животным в начале эксперимента перорально через зонд, а далее с потребляемым рационом в дозах от 0,1 до 100 мг/кг массы тела. Проведенные исследования выявили отклонения в ряде интегральных показателей (прибавка массы тела, масса внутренних органов) (и молекулярных маркеров (уровни общего белка, альбумина, глюкозы, активность АЛТ сыворотки крови) у животных, получавших НМ, однако большинство этих эффектов не демонстрировали монотонной зависимости от его дозы и (или) не могли быть интерпретированы как токсические (вредные). При наибольшей дозе НЧ SiO₂ (100 мг/кг массы тела) отмечалась выраженная лейкопения в сочетании со снижением количества CD4⁺ лимфоцитов, повышением числа CD8⁺, снижением ИРИ (CD4/CD8), многократным повышением уровня TNF-α сыворотки и тенденцией к снижению уровня IL-10. Полученные данные свидетельствуют о наличии у НЧ SiO₂ определенного иммунотоксического действия при пероральном поступлении в организм.

Результаты цитированных экспериментальных работ показывают влияние НЧ SiO₂ как на системы *in vitro*, так и *in vivo*.

Наночастицы диоксида титана

Поступление НЧ TiO₂ в организм следует признать высоко вероятным, а их токсикологические свойства заслуживают внимательного изучения, поскольку эти НЧ широко используются в потребительской продукции, включая солнцезащитные кремы [71], УФ-фильтры [89], катализаторы и очистители воздуха, медицинские препараты [198]. Как и для многих других НЧ, для ультравысокодисперсного TiO₂ показана возможность генерации РСК и стимуляции перекисных процессов в модельных системах *in vitro* [165]. Немодифицированные НЧ TiO₂ активны в реакциях фотоиндукции свободных радикалов в отличие от аналогов, покрытых оболочкой [67], что свидетельствует о возможности протекания этих реакций под действием межфазной границы TiO₂ - вода. Показано, что каталитическое образование РСК может протекать на поверхности НЧ TiO₂, также и в темноте [116].

В системе *in vitro* цитотоксичность НЧ TiO₂ охарактеризована в статье [267]. Исследование проводилось на модели монобластных клеток человека U937 с использованием НЧ размером менее 100 нм. Результаты показывают высокую способность

указанного НМ вызывать апоптоз и некроз данной линии трансформированных клеток. Эти данные подтверждаются в исследовании [186], где сравнивалось токсическое действие на опухолевые клетки частиц TiO_2 нанометрового размера и имеющих тот же состав микрочастиц. Было установлено, что именно НЧ TiO_2 , но не микрочастицы, вызывает выраженный ответ клеток, состоящий в усилении продукции провоспалительного цитокина IL-8. Однако, окислительный стресс, сопровождаемый увеличением выработки глутатиона, наблюдался при воздействии как нано, так и микрочастиц. Эти данные косвенно указывают на то, что в токсичности и провоспалительном действии TiO_2 большую роль, по-видимому, играют зависящие от размера частиц процессы их проникновения в клетки.

В работе [244] в сравнительном аспекте изучали действие нано- и микрочастиц TiO_2 , а также НЧ кварца на эпителиоциты лёгких крыс линии NR8383. Из всех тестируемых препаратов для НЧ TiO_2 в наибольшей степени была характерна индукция синтазы окиси азота; так же, как и НЧ кварца, НЧ TiO_2 вызывали повышение уровня РСК в клетках. В числе других эффектов НЧ отмечены сдвиги в выработке цитокинов, экспрессия гена гемоксигеназы. Экстраполяция этих данных на систему *in vivo* указывает на возможность развития выраженного воспалительного процесса при возможном поступлении этих НЧ во внутреннюю среду организма.

В работе [290], выполненной с использованием культур нормальных клеток человека Chang (гепатоцитов), MCF10A (эпителия молочной железы) и WI38 (лёгочных фибробластов), отмечена выработка РСК и индукция апоптоза при воздействии НЧ TiO_2 в условиях УФ-облучения. Механизм наблюдавшихся явлений состоял в активации факторов Fas и Вах вследствие, как можно предположить, генерируемых на НЧ РСК. Нокаунт генов Fas и Вах в клетках с помощью соответствующих малых интерферирующих РНК отменял эти эффекты. По мнению авторов, полученные данные необходимо учитывать в связи с рисками использования этих НЧ в потребительской продукции.

Другими возможными «воротами» для поступления НЧ TiO_2 является кожа. В этом отношении представляют интерес данные о накоплении этих НЧ в нормальных фибробластах кожи [207]. Этот процесс сопровождался выработкой РСК и признаками цитотоксичности.

В работе [182] было изучено взаимодействие гибридных НЧ диоксида титана и п-аминобензойной кислоты с модифицированными дендритными клетками, полученными из моноцитов человека. По данным конфокальной микроскопии НЧ проникали в клетки путём макропиноцитоза, но не обнаруживались в ядре. Эти данные подтверждены с помощью электронного микроскопа, причём показано, что гибридные НЧ быстро вступали в контакт с клеточной мембраной и локализовались в цитоплазматических везикулах без

перераспределения в клатрин-связанные везикулы. Гибридные НЧ не вызывали избыточную экспрессию CD86, HLA-DR и цитокинов (IL-8 и фактора некроза опухоли).

Цитотоксичность НЧ TiO₂ в рутильной и анатазной форме для клеток HaCaT изучались в работе [147]. Было выявлено, что только анатазная форма вызывает самопроизвольное образование реактивных форм кислорода. Взаимодействие между TiO₂ и клеточными органеллами происходило в обоих случаях. Повышение уровня РСК стимулировало синтез антиоксидантов клеткой или запускало механизмы митохондриального апоптоза. Авторы подчеркивают важность дальнейшего изучения взаимодействия TiO₂ с белками и ДНК.

Исследование [138] было посвящено характеристике влияния НЧ TiO₂ (15 нм) и сажи (13 нм) на эпителиальные бронхиальные клетки линии 16HBE14o. Показано, что оба вида НЧ вызывают типичные морфологические (снижение размера клеток, повреждение мембраны, концентрирование периферического хроматина, образование апоптотических тел) и биохимические (активация каспазы и фрагментация ДНК) признаки апоптоза. Предполагается, что данный процесс опосредовался образованием РСК под действием НЧ.

Авторами исследования [292] охарактеризовано воздействие НЧ TiO₂ на эндотелиальные клетки и их способность видоизменять структуру мембраны в эндотелии сосудов. Для этих НЧ, в отличие от изученных в тех же тестах НЧ оксида меди, не выявлено увеличение экспрессии ингибитора-1 плазминогена PAI-1 и увеличение образования РСК. В отличие от этого в работе [227] при воздействии НЧ TiO₂ в культуре клеток наблюдалось увеличение уровня РСК. В этой же работе в эксперименте *in vivo* на крысах наблюдали обширное легочное воспаление, которое было связано с воздействием НЧ TiO₂. Данные, полученные в опытах *in vitro* и *in vivo*, в этом исследовании совпали.

В работе [188] изучали продукцию IL-1 β макрофагами человека при воздействии рутильной и анатазной формы микро- и НЧ TiO₂. Синтез интерлейкина значительно возрастал при воздействии как рутильной, так и анатазной формы НЧ TiO₂. Данный эффект зависел от активности катепсинов и образования РСК. Влияние НЧ TiO₂ на нейтрофилы человека изучено в статье [124]. Показано, что после 24 ч воздействия НЧ в дозе до 100 мг/см³ происходит некроз клеток. В зависимости от концентрации и времени экспозиции НЧ TiO₂ происходят различные изменения в морфологии клеток. Отмечается фосфолирование двух ключевых ферментов и активация p38 MAP протеинкиназы. Присутствие НЧ влияло на сроки наступления апоптоза и продукцию цитокинов. В концентрации не менее 20 мг/см³ НЧ увеличивали апоптоз. Супернатант, полученный после 24 ч воздействия НЧ TiO₂ на клетки, был исследован по 36 показателям. 13 показателей превышали норму, включая уровень интерлейкина-8, который был увеличен в 16 раз.

В исследовании [174] определяли цитотоксичность НЧ TiO_2 на линии клеток головного мозга РС12. В зависимости от дозы НЧ от 1 до 100 мг/см^3 и времени экспозиции от 6 до 48 часов жизнеспособность клеток снижалась. НЧ аккумулировались в клетках и вызывали образование РСК с последующим апоптозом. Предварительная обработка клеток радиопротектором меркаптопропионилглицином способствовала снижению апоптоза, что подчёркивает важность реакций перекисного окисления в его развитии на данной модели.

В работе [279] на основе данных модельных экспериментов *in vitro* предполагается наличие у НЧ TiO_2 способности стимулировать сборку в мозгу фибрилл β -амилоида, что может рассматриваться как этиологический фактор болезни Альцгеймера. Остаётся, однако, открытым вопрос, могут ли НЧ данного вида проникать в ЦНС в количествах, достаточных для того, чтобы вызвать подобные эффекты.

Способность наноразмерного TiO_2 проникать через биологические барьеры и накапливаться в органах и тканях охарактеризована в ряде исследований. В работе [249] была изучена способность НЧ TiO_2 к поступлению в различные органы и ткани после внутривенного введения мышам. Было установлено, что после экспонирования животных уровень TiO_2 значительно увеличивается в крови и тканях, особенно в печени. Однако концентрация НЧ в печени снижалась в течение всего времени после экспонирования (на 30% за 1 месяц). Накопление TiO_2 не наблюдали только в головном мозге.

При внутривенном введении крысам суспензии наноразмерного TiO_2 в дозе 5 мг/кг массы тела наблюдалось увеличение их уровня в наибольшей степени в печени, а также в селезенке, легких и почках [114]. После первого дня воздействия НЧ обнаруживались во всех органах. Однако токсического эффекта по показателям уровня цитокинов и активности печеночных ферментов в крови не было выявлено, что указывает на отсутствие воспалительного ответа и токсического воздействия на органы. Поскольку системное поступление наноразмерного TiO_2 в циркуляцию в таких дозах маловероятно, авторы работы полагают, что опасность этих НЧ во всех практически важных случаях незначительна. Не очевидно, однако, что такой вывод может быть сделан на основе только острого (однократного) воздействия НЧ на организм, даже в достаточно высокой дозе.

В исследовании [84] НЧ TiO_2 вводили мышам внутрибрюшинно в заведомо агравированных, нефизиологических дозах, вплоть до 2,6 г/кг . В этих условиях отмечали выраженные признаки интоксикации, включающие пассивное поведение, потерю аппетита, тремор и летаргию. Наибольшее накопление частиц отмечено в селезенке. Отмечали тромбоз сосудов лёгких, гепатоклеточный некроз и апоптоз, фиброз печени, набухание почечных гломерул и интерстициальную пневмонию. Liu с соавторами [172], которые также вводили НЧ

TiO₂ мышам внутрибрюшинно, получили убывание степени накопления частиц в ряду печень – почки – селезенка – лёгкие – мозг – сердце. У рыб (форель), которым НЧ TiO₂ вводили парентерально, основная часть препарата оседала в почках [236]. Несмотря на частичные расхождения в данных цитируемых работ, на их основании следует заключить, что основными мишенями НЧ TiO₂ в случае их поступления в организм являются органы ретикуло-эндотелиальной системы (селезёнка, купферовские макрофаги печени), а также почки.

Исследования проникновения НЧ TiO₂ через биологические барьеры в условиях, приближающихся к физиологическим, немногочисленны и частично противоречивы. Так, авторы работ [235] и [79] показали, что НЧ TiO₂ не проникают через неповреждённую кожу. Эти результаты были поставлены под сомнение в последующем исследовании [278], где также не наблюдали проницаемости для этих НЧ на изолированном препарате кожи свиньи, однако у живых свиней и голых мышей при многократном нанесении наноматериала на кожу удавалось выявить его во внутренних органах, включая мозг. В отличие от этого, в исследовании *in vivo* [229] не удалось выявить проникновения НЧ TiO₂ через неповреждённую кожу у свиней. Подобное расхождение результатов разных авторов может быть связано с некорректностью использования некоторых изолированных препаратов кожи. Вопрос о транскутанном поступлении НЧ TiO₂, содержащегося, например, в солнцезащитных кремах, продолжает оставаться открытым.

В статье [164] изучено влияние НЧ TiO₂ на селезенку мышей при многократном внутрибрюшинном введении в течение 45 дней. Были изучены патологические изменения, апоптоз, уровень экспрессии апоптотических генов и их белков, а также оксидантный стресс. В результате было показано, что НЧ TiO₂ аккумулируются в селезенке, вызывают пролиферацию клеток лимфатических узлов и апоптоз спленоцитов. Отмечена активация каспаз 3 и 9, снижение уровня экспрессии Bcl-2 генов, увеличение экспрессии цитохрома C, образование РСК. В комплексе эти процессы, протекающие в селезенке, предложено рассматривать как проявления иммунотоксического действия.

По данным [151] после инъекций НЧ TiO₂ разной дисперсности мышам, отмечались признаки воспалительного процесса, сходного с индуцируемым липополисахаридом. Клетки головного мозга, на который воздействовали ультрадисперсными частицами TiO₂, продуцировали провоспалительные вещества, такие как интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли, а также повышенные уровни РСК. Таким образом, показано, что НЧ TiO₂ вызывали образование провоспалительных веществ в клетках головного мозга.

В статье [187] НЧ TiO₂, чистые и связанные с липополисахаридом, вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг. Чистые НЧ вызывали увеличение притока нейтрофилов,

уровня белка в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BAL), увеличение РСК в клетках BAL. После воздействия НЧ был увеличен уровень провоспалительных медиаторов: фактора некроза опухоли- α , интерлейкина- 1β и фактора воспаления макрофагов MIP-2 в BAL. Чистые НЧ диоксида титана также вызывали значительное увеличение уровня сигнальных молекул, таких как c-Src и p38 MAP протеинкиназы в легочных тканях и альвеолярных макрофагах. В результате связывания НЧ с липополисахаридом их эффекты значительно усиливались. Авторы статьи указывают на возможность синергического эффекта взаимодействия НЧ и бактериального эндотоксина - липополисахарида. Данный результат следует принимать во внимание при оценке многочисленных результатов тестирования НЧ на моделях *in vitro* и при парентеральном введении животным, поскольку некоторые образцы НМ могут быть непреднамеренно загрязнены липополисахаридом.

По данным [238] НЧ TiO_2 вызывают выраженное воспаление в здоровой и воспаленной вследствие обработки липополисахаридом ткани головного мозга мышей после внутрибрюшинного введения. При воздействии НЧ размером 21 нм в микроглии наблюдалось увеличение провоспалительных цитокинов, интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли. Спустя 24 часа наблюдалось увеличение уровня РСК.

Ингаляционная токсичность НЧ TiO_2 была исследована в [128] у мышей. Животных подвергали ингаляции НМ однократно в остром опыте (4 часа) или хронически (по 4 часа в день на протяжении 10 дней). При остром воздействии в концентрации от 0,77 до 7,22 мг/м³ токсическое действие на лёгкие, выявляемое в тестах анализа бронхоальвеолярного лаважа, было минимальным. Однако при хроническом воздействии НЧ в концентрации 8,88 мг/м³ отмечали достоверное возрастание общего числа клеток и количества альвеолярных макрофагов в лаваже. При гистологическом исследовании лёгких сразу же после воздействия отмечали выраженные признаки воспаления. Однако через 3 недели после последней ингаляции все показатели приходили в норму.

В исследовании [83] при ингаляционном пути введения НЧ TiO_2 мышам ICR наблюдали развитие эмфиземы легких, увеличение количества макрофагов, обширные разрушения альвеолярных мембран, пневмоцитогиперплазию 2-го типа, апоптоз эпителиальных клеток.

На механизмы провоспалительных эффектов ультравысокодисперсного TiO_2 при ингаляционном пути введения, возможно, проливают свет данные работы [57], в которой семинедельным крысам внутритрахеально вводили суспензию частиц TiO_2 . Использовались две группы, одна из которых была подготовлена предобработкой циклофосфамидом, а вторая - дексаметазоном. Через определенные промежутки времени крыс анестезировали, промывали бронхо-альвеолярную полость введением солевого раствора, отбирали и исследовали лаважную

жидкость. Методом ПЦР-обратной транскрипции было обнаружено, что НЧ вызывают экспрессию генов GCH и Muc5ac (наблюдали увеличение количества РНК у подготовленных групп). Наблюдали также увеличение количеств бокаловидных клеток, что, скорее всего, было связано с повышением выработки IL-13.

Интратрахеальная инстилляционная наноразмерного TiO_2 вызывала хроническое воспаление в лёгких мышей, с увеличением экспрессии IL-12, IFN- γ , IL-4,5 и 10, что свидетельствует о необычной активации Т-клеточного ответа одновременно как по Th1, так и по Th2 типу [210]. В работе [200] ингаляционную токсичность НЧ TiO_2 для крыс связывают с индукцией воспалительной реакции по пути, опосредуемому изменением реакции клеток на сигнальный медиатор-окись азота. В большом числе недавних работ эффекты НЧ TiO_2 были подробно охарактеризованы при различных схемах введения (интратрахеально или ингаляционно, однократно или многократно, изолированно или в сопоставлении с токсичностью модельных заведомо токсичных НМ - углеродной сажи и кварца) [154; 166; 177; 231; 269]. Во всех случаях выявлена воспалительная реакция лёгочной ткани, хотя и менее выраженная, чем в случае сажи и кварца, и, зачастую, обратимая. Установленным фактом является миграция НЧ через лёгочный барьер в циркуляцию с последующим накоплением почками и печенью.

Авторы исследования [225] воздействовали на мышей НЧ TiO_2 и НЧ SiO_2 ингаляционно в течении 2-х часов по 4 дня в неделю в течении 4 недель. При этом было установлено, что рутил и анатаза, так же как и НЧ SiO_2 , не вызывали обширного воспаления. Наблюдалось увеличение продукции нейтрофилами лёгочной ткани TNF- α и увеличение уровня хемокинов в лёгочной ткани. В работе [160] исследовали влияние НЧ TiO_2 на организм крыс при ингаляционном введении в концентрации 10 мкг/м^3 . При этом было охарактеризовано влияние НЧ на биохимические и функциональные показатели коронарных артериол. Выявленные эффекты с большой вероятностью связаны с увеличением образования РСК при микроциркуляции.

Авторы исследования [228] обсуждают возможную ингаляционную токсичность НЧ TiO_2 в условиях реального промышленного использования, например, при малярных работах в составе красок. Представленные данные модельных экспериментов на мышях свидетельствуют, что ингаляционная токсичность НЧ диоксида титана значительно снижается, если они ингалируются в составе микрочастиц краски.

Сравнительный анализ действия для крыс различных кристаллических форм TiO_2 (рутила и анатазы) в виде микро- и НЧ показал [275], что ингаляционная токсичность указанных частиц варьирует в широких пределах, от необнаружимо малой до значительной, в зависимости от ряда параметров, включая степень дисперсности, кристаллическую структуру,

химическую модификацию поверхности и внутреннее значение рН гидратированных частиц. Данные о биологическом действии, полученные для одной из разновидностей частиц, нельзя переносить на остальные механически. С этим возможно связаны расхождения в ряде исследований, в которых тестировали токсические свойства частиц различного происхождения. Так, результаты испытаний НЧ TiO_2 в большом числе биологических тестов, не дали убедительных доказательств его вредного действия [274]. В частности, в системах *in vivo* по данным авторов отсутствовала лёгочная токсичность, свойства раздражения кожи и кожной сенсибилизации. Наблюдавшийся эффект раздражения конъюнктивы глаза у кроликов был слабо выраженным и транзиторным. Пероральная токсичность отсутствовала. Генотоксические свойства в тестах на культурах микроорганизмов и на яйцеклетках китайского хомяка не проявлялись. Неблагоприятные воздействия на гидробионтов (дафнии, форель) были слабо выраженными. Общий вывод из работы состоит в низкой потенциальной опасности НЧ TiO_2 для живых организмов.

В работе [184] изучали отдалённые последствия ингаляции НЧ TiO_2 мышами, имеющими в обеих аллелях дефект гена аполипопротеина Е, то есть наследственно склонных к развитию атеросклероза. В этих условиях под воздействие НЧ значительно усиливалось развитие атеросклеротических бляшек в аорте. Таким образом, данный вид НЧ может обладать атерогенным действием. Модель крыс линии Агути, наследственно предрасположенных к воспалительным реакциям, была использована в исследовании [132], где НЧ TiO_2 вводили в лёгкие животных на протяжении 90 дней. Выявлена пролиферация лимфоцитов Т-хелперов в лёгких, сопровождающаяся потенцированием продукции ряда провоспалительных цитокинов. Данный результат указывает на возможное наличие у НЧ TiO_2 иммунотоксического действия. По данным работы [82] НЧ TiO_2 являются гистаминолибераторами, т.е. способны вызывать антиген-неспецифическое выделение гистамина (медиатор аллергических реакций) из тучных клеток. Это может свидетельствовать о возможности усиления аллергических реакций (проаллергенном действии) этих НЧ в определённых условиях воздействия.

Данные об эффектах НЧ TiO_2 при пероральном пути поступления (с пищей) немногочисленны. В работе [155] изучали пути поступления НЧ TiO_2 в организм человека. Показано, что в концентрации 10 мг/см^3 и выше эти НЧ всасываются в кишечнике путем эндоцитоза. При этом происходят изменения в апикальных слоях микроворсинок, что сопровождается высвобождением свободных ионов кальция. Результаты анализов показывают, что при воздействии НЧ TiO_2 гибель клеток не происходит, но нарушается питание и снижается продолжительность их жизни.

Авторы исследования [75] изучали оральную токсичность НЧ TiO_2 на крысах Wistar в дозах 0,16, 0,4 и 1 г на кг массы тела. При исследовании мочи крыс после воздействия НЧ TiO_2 было выявлено увеличение уровня таурина, цитратов, гиппурата, гистидина, триметиламин-N-оксида (ТМАО), цитруллина, альфа-кетоглутарата, фенилацетилглицина и ацетата. В то же время наблюдалось снижение уровня лактата, бетаина, метионина, треонина, пирувата, 3-D-гидроксипирувата (3- D-ГБ), холина и лецитина. Метаболический анализ сыворотки крови показал увеличение ТМАО, холина, креатинина, ацетоацетата, фосфохолина и метионина; были повышены активности аспаратаминотрансферазы, креатинкиназы и лактатдегидрогеназы; было обнаружено набухание митохондрий в клетках сердечной мышцы. Представленные данные указывают на нарушение энергетического и аминокислотного обмена у животных, подвергнутых воздействию НЧ TiO_2 перорально.

На возможность влияния НЧ TiO_2 при пероральном приеме на протеом печени крыс указывают данные работы [38], в которой под воздействием этих НЧ в различных дозах на электрофореграммах микросомальной фракции появлялись 53 новых белковых пятна, и исчезало 19 белковых пятен по сравнению с контролем. При наибольшей дозе НЧ, отмечено появление 25 новых белковых пятен при исчезновении 3 белковых пятен. В целом, выявленные изменения в протеоме не были дозозависимыми. Методом MALDI-масс-спектрометрии среди экспрессируемых белков выявлен ряд форм, присутствующих в международной базе данных. В том числе, было обнаружено усиление экспрессии изоформы $\mu 2$ фермента глутатион-S-трансферазы ($M=41,55$ кД; $pI=8,0$), играющей важную роль при II стадии печеночной детоксикации ксенобиотиков.

В статье [105] описаны физиологические и биохимические реакции мышей при внутрижелудочном введении им НЧ TiO_2 в анатазной форме. Было показано, что НЧ TiO_2 снижают массу животных, увеличивают количество патологических изменений в тканях. У особей, которые принимали НЧ TiO_2 , наблюдалось увеличение интерлейкинов, изменения в крови, снижение гемоглобина, тромбоцитов, ретикулоцитов, Т и В лимфоцитов (CD 3 +, CD 4+, CD 8+); соотношение CD 4+ /CD 8+ также было снижено. Кроме того, было обнаружено увеличение активности АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназы, холестерина, увеличение общего белка, снижение соотношения альбумина/глобулина, общего билирубина, триглицеридов. Полученные результаты показывают, что высокие дозы НЧ TiO_2 не безопасны и оказывают отрицательное влияние на систему крови.

В работе [35] водные дисперсии НЧ TiO_2 вводили внутрижелудочно через зонд растущим крысам самцам линии Вистар ежедневно на протяжении 28 дней. Определяли прирост массы тела, относительную массу внутренних органов, проницаемость кишечного

барьера для макромолекул белка, показатель окислительного повреждения ДНК, уровень небелковых тиолов, состояние системы I и II фазы детоксикации ксенобиотиков, стабильность лизосомальных мембран печени, биохимические и гематологические показатели крови. Получены данные, свидетельствующие о возможных токсических рисках, связанных с воздействием наноразмерного диоксида титана, и указывающие на необходимость его гигиенического нормирования в составе материалов, контактирующих с пищей, косметических средств и других видов продукции.

Как показано в [45], НЧ диоксида титана, вводимые в ЖКТ крыс, способны оказывать определенные воздействия на состояние кишечного микробиоценоза. Это проявляется, в частности, в повышении уровня гемолитических стрептококков и снижении антагонистической кислотообразующей активности нормальной бифидофлоры. Сравнение с соответствующими контрольными группами показывает, однако, что такие же или даже большие по размеру эффекты наблюдаются и при введении в пищеварительный тракт обычного TiO_2 с частицами микронного размера, то есть определяются биологическими свойствами TiO_2 как химического соединения, а не размерами его частиц.

В работе [117] представлена сводка ранних исследований, посвященных проникновению НЧ TiO_2 (а также ряда других наноматериалов) через барьер слизистой оболочки кишки. Общий вывод, полученный из обобщения представленных данных, заключается в том, что прямых свидетельств возможности проникновения НЧ TiO_2 через стенку кишки в норме получено не было, однако этот процесс не может быть исключен в определенных патологических условиях (например, при воспалении, когда проницаемость кишечной стенки может быть увеличена).

Непосредственная оценка всасывания в кишечнике наночастиц TiO_2 радиоизотопным методом (с использованием наночастиц, меченных изотопами ^{46}Sc и ^{47}Sc путём облучения на ускорителе протонов) показала, что всасывание этих наночастиц является очень низким (не более 0,1% в сумме по всем изученным органам); более 99,8% наночастиц выводились из организма с калом [3]. С использованием ТЭМ было показано, что при введении НЧ TiO_2 в изолированную петлю подвздошной кишки крыс основная часть наноматериала локализуется в просвете кишки, в пристеночном слое слизи и на поверхности апикальных микроворсинок энтероцитов. Только очень небольшие количества свободных НЧ и их небольших агрегатов проникали в клетки и могли быть выявлены в апикальной части клеток под плазматической мембраной и в более глубоких частях цитоплазмы. Поступления НЧ и их агрегатов в более глубокие слои клеток, в ядро, органеллы, в собственную пластинку слизистой оболочки выявлено не было; НЧ TiO_2 не оказывал значимого влияния на ультраструктурную морфологию

энтероцитов, в том числе не приводил к нарушению их плотных контактов. В совокупности представленные работы свидетельствуют, что всасывание наночастиц TiO_2 в кишечнике здоровых животных, в принципе, возможно, но протекает, по-видимому, в очень малых, следовых количествах.

Возможные иммунотоксические свойства НЧ TiO_2 для лабораторных животных были исследованы как при парентеральном, так и при пероральном пути поступления. Так, в работе [159] мышей внутрибрюшинно иммунизировали овалбумином в комбинации с НЧ TiO_2 . В полученном от животных бронхолёгочном лаваже выявлены клетки воспаления и большое количество интерлейкинов-4, 5, 10 и интерферона- γ . В сыворотке наблюдалось увеличение специфических иммуноглобулинов Е и G по сравнению с контрольными животными, получавшими только овалбумин. Был сделан вывод, что НЧ TiO_2 обладают значительным иммуноадьювантным действием. Влияние перорального приема НЧ TiO_2 в форме рутила на состояние системы иммунитета у нормальных и сенсibilизированных овалбумином животных было изучено в работе [3]. Под действием НЧ было выявлено усиление гуморального иммунного ответа на овалбумин, достоверное снижение уровня незрелых клеток и относительного числа В-лимфоцитов на фоне иммунизации, а также достоверное повышение фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов периферической крови у неиммунизированных животных. Полученные данные свидетельствуют о способности перорально вводимых НЧ рутила влиять на показатели специфического и неспецифического иммунитета, в том числе, стимулировать дифференцировку В-клеток в зрелые плазмоциты с усилением гуморального иммунного ответа. Механизм этих эффектов, с учетом низкой всасываемости данного вида наночастиц, остается неясным; возможно, он реализуется на уровне местного влияния НЧ на ассоциированную со слизистой оболочкой кишки лимфоидную ткань, либо опосредуется сдвигами в составе кишечной микрофлоры.

В ряде работ были охарактеризованы потенциальные канцерогенные свойства ультравысокодисперсного TiO_2 . Так, авторы исследований [136; 260] показали в опытах на животных возможность повышения риска развития рака легких при ингаляции этого вида НЧ. При этом в [136] отмечено статистически значимое увеличение аденокарцином и доброкачественной чешуйчато-клеточной опухоли у крыс, получавших респираторно диоксид титана в форме частиц размером 15-40 нм в концентрации 10 мг/м^3 в течение 2 лет. Следует отметить значительную степень аггравации доз НЧ и длительности их воздействия в цитируемых работах, что заставляет относиться к их результатам с определённой осторожностью.

По данным международного агентства по исследованию рака (МАИР) [141; 142] НЧ TiO_2 , так же, как и аморфный углерод (сажа), могут быть отнесены к группе веществ 2В по канцерогенности, то есть тех, для которых проявление канцерогенных свойств является вероятным, но не доказанным.

Сведения о соотношении гено- и цитотоксичности НЧ TiO_2 *in vitro* достаточно противоречивы. В работе [133] клетки слизистой оболочки носа человека экспонировали НЧ TiO_2 в концентрации 10-100 мкг/см³. Частицы проникали в цитоплазму и в ядро. По данным теста исключения трипанового голубого и FDA жизнеспособность клеток при этом существенно не снижалась, однако комет-тест показал увеличение повреждения ДНК.

НЧ TiO_2 обладали *in vitro* генотоксическим действием по данным [271]. Их фотогенотоксическое действие *in vitro* показано [193]. В отсутствие УФ облучения этот эффект не проявлялся. Работа, выполненная на эмбриональных клетках хомяка [220], показала возможное наличие у НЧ TiO_2 эмбриотоксического действия. Однако *in vivo* НЧ TiO_2 P25 (с гидрофильной поверхностью) и покрытый гидрофобной оболочкой TiO_2 T805 не обладали генотоксическим действием в клетках легких крыс, в отличие от кварца [222].

В статье [127] был изучен острый электрофизиологический эффект НЧ TiO_2 на микроэлектродной сетке нейрочипов, полученных на основе нейронов головного мозга мышей. В результате было выявлено, что изменения в электрической активности зависят от структуры НЧ и их концентрации. Авторами был обнаружен захват НЧ диоксида титана, а также сажи и гематита (оксида железа) глиальными клетками и нейронами. После 24 часов экспонирования НЧ TiO_2 вызывали внутриклеточное образование активных форм кислорода. По мнению авторов работы, эти данные указывают на возможную нейротоксичность НЧ TiO_2 .

По объёму своего производства НЧ TiO_2 занимает одно из лидирующих мест среди нанопорошков. Считается, что наиболее вероятным сценарием их действия является экспонирование этими НЧ работников производств, в том числе в строительной индустрии при использовании красок и пигментов, содержащих TiO_2 в наноразмерной форме [156]. В этой связи санитарно-гигиеническое нормирование НЧ TiO_2 , представляется высоко актуальным. Согласно нормативам, действующим в США, ПДК ультратонких частиц диоксида титана при 40 ч рабочей неделе составляет 0,1 мг/м³ в воздухе рабочей зоны [264]. Такой же норматив в настоящее время установлен в Российской Федерации. Оценка группой китайских авторов реальной экспозиции персонала на предприятии, производящем нанопорошок анатазы с частицами диаметром 10-30 нм, показала, что имеется ненулевой риск вредного воздействия, требующий разработки адекватных мер защиты [148].

Значительную озабоченность научной общественности вызывает возможное вредное действие наноматериалов, в том числе, НЧ TiO_2 , на экосистемы. В работе [135] изучили экотоксичность таких частиц диаметром 10 и 30 нм для пресноводной зелёной водоросли. По данным [185] токсическое действие НЧ TiO_2 на фитопланктон реализуется только на свету, в условиях фотокаталитической генерации РСК.

В работах [300; 64] был проведён ряд экспериментов с использованием дафний, на которых воздействовали анатазной и рутильной формами НЧ TiO_2 в условиях как острой, так и продолжительной (т.н. «хронической») экспозиции. Показано, что при воздействии этого НМ в течение 48 часов токсичность была минимальной, однако она резко увеличивалась после экспозиции в течение 72 часов, а при хроническом воздействии на дафний НЧ TiO_2 в течение 21 дня рост организмов замедлялся и увеличивалась смертность. Дафнии аккумулировали НЧ TiO_2 , концентрируя их, что создаёт возможность передачи по пищевой цепи к другим организмам. Таким образом, при попадании в среду обитания водных организмов НЧ TiO_2 могут оказывать влияние на их рост, развитие и размножение, а также способны к аккумуляции, что представляет определенный риск для водных экосистем.

Целью исследования [118] была характеристика влияния НЧ TiO_2 в концентрации 0,03 г/кг на жизнеспособность моллюска пескожила в остром токсикологическом эксперименте в течение 10 дней. Было выявлено воздействие НЧ TiO_2 на клетки пескожила- целомоциты и зафиксировано наличие НЧ TiO_2 в просвете кишечника моллюска.

Авторы статьи [152] изучали возникновение оксидативного стресса при воздействии НЧ TiO_2 на дафний (*Daphnia magna*) в остром и хроническом эксперименте. Определяли активность четырех антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Отмечено значительное увеличение смертности при концентрациях НЧ 5 и 10 мг/дм³, однако репродуктивная способность выживших животных не снижалась. При воздействии НЧ TiO_2 также дозозависимо увеличивалась активность антиоксидантных ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, но не супероксиддисмутазы. Данные работы [272] свидетельствуют о том, что кратковременное воздействие НЧ TiO_2 в низкой дозе не приводит к замедлению эмбрионального развития и не увеличивает нейротоксичность сетчатки глаза зебрафиш.

В работе [201] изучались выбросы в атмосферу и на поверхность воды НЧ TiO_2 , серебра и диоксида церия в условиях функционирующего нанотехнологического производства. Оценённый риск ингаляционного и перорального поступления НЧ для водных организмов был очень низким. Высвобождение НЧ TiO_2 и серебра в водоёмы рассматривается как умеренный экотоксикологический фактор риска.

Существенно также, что НЧ TiO_2 , поступающие во внешнюю среду со сточными водами и бытовыми отходами, могут накапливаться в высоких концентрациях в организмах гидробионтов [272] и далее передаваться человеку по пищевой цепи.

Таким образом, результаты исследования биологического действия НЧ TiO_2 на данный момент неоднозначны. Возможность проявления ими цитотоксических, общетоксических, генотоксических и канцерогенных свойств зависит от ряда факторов, в первую очередь, от степени дисперсности частиц [223], а также от их кристаллической структуры, степени гидратации, модифицируемых поверхностных свойств, дозировки и длительности воздействия. Большого внимания, по-видимому, заслуживает недостаточно освещённая в литературе проблема передачи НЧ TiO_2 по пищевым цепям, так как в перспективе ожидается всё возрастающий выброс этих частиц во внешнюю среду с бытовыми отходами.

Наночастицы оксида алюминия

Взаимодействие НЧ Al_2O_3 с белками было выявлено по влиянию на активность фермента малатдегидрогеназы в бесклеточной системе *in vitro* [285]. Бактерицидное действие НЧ Al_2O_3 исследовано в работе [146]. По выраженности эффекта данный НМ занимал промежуточное положение между оксидами цинка и кремния.

В исследовании [85] показано, что смешанные НЧ оксидов магния и алюминия, цинка и алюминия не влияли на пролиферацию, не вызывали повреждение мембран и лизис в различных культурах клеток. При этом в работе [100], выполненной на яйцеклетках китайского хомячка, получены противоречащие большинству других исследований данные, согласно которым НЧ Al_2O_3 были высоко цитотоксичными и генотоксичными.

Цитотоксический потенциал НЧ Al_2O_3 в сравнении с НЧ TiO_2 изучали в статье [101] на модели линии клеток UMR 106 с использованием стандартного МТТ теста. В результате, помимо выявленных изменений функциональной активности, отмечено накопление НЧ во внутриклеточных везикулах и при наибольших из тестированных концентраций – гибель клеток.

В работе [219] изучена токсичность НЧ Al_2O_3 на ряде моделей клеточных культур млекопитающих. Показано, что НЧ способны проникать через мембраны клеток линий L929 и VJ. Однако существенного влияния на гибель клеток и выраженность процессов апоптоза установлено не было. Как показано в [102], НЧ Al_2O_3 были токсичны для стволовых клеток нервной системы только в очень высокой концентрации в культуре – 200 мкг/см^3 . Предположительно, токсический эффект был связан с генерацией РСК. НЧ Al_2O_3 не были

цитотоксичными на модели клеток эндотелия сосудов сердца человека [252] в отличие от сходных по размерам частиц оксидов цинка, меди и магния.

В работе [74] изучали ответ цитокинов в ряде клеточных линий человека на введение различных бактериальных патогенов в присутствии и в отсутствие НЧ Al_2O_3 . Показано, что данный НМ, не будучи токсичен для клеток сам по себе, способен подавлять стимулированную патогеном выработку цитокинов, что может означать угнетающее влияние на иммунный ответ.

В сравнительном исследовании [151] изучали действие большого числа препаратов металлооксидных НЧ (алюминия, титана, церия, цинка) на культуру лёгочных клеток человека L-132 и клетки карциномы A549. Показано, что среди всех изученных видов НМ цитотоксичность НЧ Al_2O_3 была наименьшей и практически не проявлялась, за исключением самых высоких концентраций.

Сведения о действии НЧ Al_2O_3 на высших животных *in vivo* относительно немногочисленны. Так, ингаляция крыс НЧ Al_2O_3 диаметром 10-40 нм в концентрациях 0,4-28 мг/м³ в течение 4 недель вызывала гистопатологические изменения в ткани лёгких, бронхолёгочном лаваже и плевральных лимфатических узлах. По некоторым данным, действующей формой НМ были агрегаты частиц, достигающие субмикронного размера [213], тогда как собственно НЧ не обладали ингаляционной токсичностью.

На модели мышей показано, что НЧ Al_2O_3 проявляли нейротоксические свойства *in vivo*, показателем чего было изменение поведенческих реакций [295]. Молекулярные механизмы выявленных эффектов связывают с развитием оксидативного стресса и активацией гена каспазы 3.

По данным [262] генотоксичность НЧ Al_2O_3 , используемых в хирургических имплантах, для различных клеточных линий человека была низкой. Авторы заключают, что этим эффектом вполне можно было пренебречь на фоне выраженного генотоксического действия содержащихся в этих же изделиях НЧ хром-кобальтового сплава. В работах [72; 276,] обсуждается наличие у НЧ Al_2O_3 нейротоксического действия (в частности, в связи с патогенезом болезни Альцгеймера) и возможности проникать через гематоэнцефалический барьер.

Мутагенность *in vitro* НЧ Al_2O_3 исследовали в микробиологическом тесте Эймса в работе [63]. Какого-либо мутагенного эффекта для данного вида наноматериала в этом исследовании выявлено не было. Эти данные подтверждаются работой [206], в которой изучали действие на бактерии большого числа НЧ (Al_2O_3 , кобальта, меди, титана, и цинка). Среди всех

охарактеризованных наноматериалов НЧ оксида алюминия не были мутагенными и не ингибировали рост бактерий.

Экотоксичность НЧ Al_2O_3 тестирована на ряде моделей беспозвоночных организмов. Как было показано в работе [163] добавленные в воду в концентрации 200 мг/дм^3 НЧ подавляли процессы энергетического обмена у дафнии *Ceriodaphnia dubia*, возможно, по механизму генерации РСК. Токсическое действие данного вида НЧ при добавлении их в донный субстрат (песок) выявлено и для пресноводного моллюска *Physa acuta* [190]. Основные проявления неблагоприятного действия состояли в эмбриотоксических эффектах. Токсичность и биоаккумуляция НЧ Al_2O_3 в работе [87] была тестирована у почвенного червя *Eisenia fetida*. В результате показано, что НЧ могут влиять на репродуктивную активность и поведение данного беспозвоночного, однако только в высоких дозах, создание которых в реальных условиях контаминации окружающей среды маловероятно. Этой же группой авторов [247] исследовано влияние НЧ Al_2O_3 на равноногого рачка (мокрицу) *Hyalella azteca*. Токсический эффект был специфичным для нано-формы и не проявлялся для Al_2O_3 традиционной дисперсности. Анализ зависимости доза-эффект показал, что значимое воздействие НЧ на данный организм достигается также при очень высоких дозах, появление которых в окружающей среде даже вблизи промышленных предприятий, выпускающих данный НМ, маловероятно.

НЧ Al_2O_3 , как было показано в исследовании [181] были способны проникать через кожные покровы у мальков зебрафиш (*Danio rerio*) и вызывать патологические эффекты, проявляющиеся в гемостазе, нарушении микроциркуляции и ишемии.

Токсическое действие НЧ Al_2O_3 на насекомых *Sitophilus oryzae* и *Rhyssopertha dominica* было охарактеризовано в работе [246]. Данный эффект позволил авторам предложить данный НМ для использования в качестве инсектицида.

Экологические последствия поступления НЧ Al_2O_3 в окружающую среду могут быть обусловлены способностью этого НМ накапливаться в зеленых растениях [77]. Важную роль в качестве промышленного токсиканта играют НЧ Al_2O_3 , образующиеся на большом числе производств в процессах сварочных работ с алюминием и его сплавами [216].

Гидроксिलированные фуллерены (фуллеренолы).

Фуллерены, представляющие собой каркасные производные углерода, образованные молекулами из 60, 70 или большего числа углеродных атомов, по проявляемым физико-химическим свойствам занимают промежуточное положение между истинными молекулярными растворами веществ и дисперсиями НЧ. Размер первичных частиц (молекул) фуллеренов составляет около 1 нм, однако даже в неполярных органических растворителях, в

которых они хорошо растворимы, отмечается значительная агрегация этих частиц. Тем более, в водных растворах и в биологических жидкостях фуллерены представлены исключительно крупными агрегатами (наночастицами, микро- или даже макрочастицами), содержащими от сотен до многих тысяч отдельных молекул [33]. В отличие от немодифицированных (нативных) фуллеренов их полигидроксилированные производные (фуллеренолы) хорошо растворимы в воде и биологических жидкостях с образованием слабо агрегированных молекулярных растворов [33].

Актуальность исследования в области токсикологии фуллеренов и фуллеренолов связана с широкими перспективами их применения в электронной промышленности, фармакологии, сельском хозяйстве и других отраслях. Существуют, в частности, разработки, указывающие на возможность использования фуллеренов и их производных в качестве радиопротекторов и даже пищевых добавок с антиоксидантным действием [73; 122; 120; 168; 253; 261]. В результате этого, экспозиция человека как нативными, так и модифицированными фуллеренами в среднесрочной перспективе будет значительно возрастать.

Число работ по токсикологической оценке фуллеренолов в системах *in vitro* и *in vivo* относительно невелико по сравнению с немодифицированными фуллеренами, особенно фуллереном C_{60} , являющимся одним из наиболее популярных объектов в нанотоксикологии.

По данным исследования [298] фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ проявлял свойства токсичности на свету для кератиноцитов человека. По сравнению с комплексом немодифицированный фуллерен C_{60} -циклодекстрин, данное соединение было менее токсичным в 60 раз при том, что в случае обоих воздействий было выявлено образование РСК (супероксида и синглетного кислорода) на свету. Аналогичные данные были получены на эпителиальных клетках хрусталика человека в работе [224]. Было показано, что механизм токсичности фуллеренола опосредуется фотокаталитическим образованием синглетного кислорода; в роли ингибитора (протектора) при этом выступал каротиноид лютеин. Несмотря на низкую токсичность фуллеренола, его накопление в клетках хрусталика в течение длительного времени может, по мнению авторов, привести к неблагоприятным последствиям.

В экспериментах на различных клеточных линиях, включая клетки мышинной фибросаркомы L929, крысиной глиомы tC6, глиомы человека U251 цитотоксичность фуллеренола была в 1000 и более раз ниже, чем у гомологичного немодифицированного фуллерена [144]. В отличие от фуллерена, вызывавшего быстрый некроз без фрагментации ДНК в перечисленных линиях клеток, фуллеренол характеризовался индукцией апоптоза, сопровождаемого фрагментацией ДНК, и повреждением клеточной мембраны. Введение N-ацетилцистеина, являющегося ингибитором фотоокисления, отменяло только эффект

фуллеренола, но не фуллерена. В свою очередь, эффект последнего блокировался ингибитором каспазы. По мнению авторов работы, эти данные свидетельствуют о различных механизмах токсичности фуллеренола и фуллерена: если для фуллерена основную роль в этом играют фотокаталитические процессы с продукцией РСК, то в основе действия фуллеренола - индукция апоптоза, опосредуемая активацией внутриклеточного протеолиза каспазами.

Данные экспериментов *in vivo* свидетельствуют, в основном, о низкой токсичности фуллеренола. Так, при интратрахеальном введении водного раствора $C_{60}(OH)_{24}$ крысам он производил только транзиторное воспалительное действие, маркерами которого были содержание клеток, окислителей и глутатиона в бронхолёгочном лаваже, клеточная пролиферация и морфологическая картина ткани лёгких [233].

По мнению авторов большинства исследований гидроксилирование фуллеренола, сопровождающееся резким возрастанием его гидрофильности и растворимости, одновременно настолько же существенно снижает его токсичность. В частности, по данным [234] фуллеренолы были менее токсичны, чем гомологичные им фуллерены, в 7 раз и более. Фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ не был цитотоксичным для яйцеклеток хомяка даже в концентрации 2 мМ (более 2 мг/см³), что намного превышает его возможный уровень в организме при естественном пути поступления [189]. По данным [282] фуллеренол в высоких концентрациях был цитотоксичен для клеток эндотелия сосудов человека, но практически не проявлял токсичности в системе *in vivo*.

При внутрибрюшинном введении мышам в остром опыте LD_{50} фуллеренола составила 1,2 г/кг [33], то есть это вещество может быть отнесено к IV классу опасности (малоопасные вещества) по ГОСТ 12.1.007-76. При парентеральном введении мышам водорастворимого производного фуллерена в дозе до 500 мг/кг ежедневно на протяжении недели гибели животных не было выявлено [281].

Подострая пероральная токсичность фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ была изучена на растущих крысах самцах в эксперименте продолжительностью 28 суток в [46]. Препарат вводили внутривентрикулярно через зонд в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг м.т. ежедневно. Выявлены изменения в таких показателях организма животных, как изменение активности изоформ цитохрома P450 CYP1A1 и CYP1A2, увеличение активности глутатионтрансферазы, снижение содержания перекисных соединений в плазме и активности глутатионредуктазы в эритроцитах, увеличение уровня мочевой кислоты, процентного содержания моноцитов и относительного содержания незрелых гранулоцитов, а также снижение содержания Hb в эритроцитах. Часть из указанных эффектов не являлись дозозависимыми или не могли быть расценены как вредные (токсические). Максимальная недействующая доза фуллеренола при длительном пероральном

поступлении оценивается авторами работы величиной 0,1 мг/кг м.т. Так, в работе [263] были охарактеризованы радиопротекторные эффекты $C_{60}(OH)_{24}$ для крыс, подвергнутых рентгеновскому облучению. В модельной системе *in vitro* фуллеренол ингибировал вызванное ионами Fe(II) перекисное окисления липидов в ткани мозга крыс [168], а также блокировал прооксидантное действие перекиси водорода или перекиси кумола [261].

Металлоэдрический аддукт высшего фуллеренола с атомом гадолиния $C_{82}(OH)_{22}@Gd$ проявлял противоопухолевую активность *in vivo*, будучи при этом мало токсичным [81]. В системах *in vitro* и *in vivo* это соединение проявляло свойства иммуномодулятора, повышающего активность хелперов Th1 типа, сопровождаемую повышенной выработкой TNF- α , IFN- γ и ИЛ-2 и пониженной – ИЛ-4,5,6 [175]. Металлоэдрические комплексы фуллеренов и фуллеренолов рассматриваются в настоящее время как перспективные средства в химиотерапии злокачественных опухолей [289].

1.3 Влияние наночастиц и наноматериалов на действие веществ традиционной степени дисперсности

Оценивая риски для здоровья, создаваемые НЧ и НМ, следует иметь в виду, что они находятся в составе объектов окружающей среды и в пищевых продуктах не изолированно, а в комплексе с другими веществами, в том числе с ионами токсичных металлов [97]. В настоящее время в литературе высказывается предположение о возможности потенцирования действия токсикантов различной природы вследствие их взаимодействия с НЧ, в частности, адсорбции с последующим облегченным захватом НЧ клетками и высвобождением токсиканта во внутриклеточной среде [93; 107], что получило название т.н. эффекта «тройного коня» [67; 171].

Другим аспектом синергического токсического действия НЧ и токсикантов традиционной природы может быть их совместное воздействие на обладающие пороговым эффектом механизмы токсичности, такие, как генерация РСК и развитие оксидантного стресса [257; 91; 171].

В работе [241] смесь, состоящая из НЧ диоксида титана в концентрации 0,1 мг/дм³ и ДДТ в концентрации 0,001-0,1 ммоль/дм³ оказывала генотоксическое влияние на клетки печени человека. При совместном воздействии на клетки низких концентраций НЧ диоксида титана и ДДТ наблюдался эффект синергизма, который способствовал развитию окислительного стресса, образованию свободных радикалов, перекисному окислению липидов, изменению в хромосомах и проявлениям генотоксичности.

В работе [137] было исследовано влияние наночастиц Al_2O_3 на токсическое действие Pb в одноклеточном морском фитопланктоне *Isochrysis galbana*. Присутствие наночастиц Al_2O_3 не

оказывает влияния на токсическое действие Pb при концентрации НЧ 1 мг/дм³, но увеличивает его при концентрациях НЧ 10 мг/дм³ и 100 мг/дм³. Синергетический эффект был также обнаружен в отношении токсического действия Pb в присутствии 10 мг/дм³ наночастиц Al₂O₃. Присутствие наночастиц Al₂O₃ в концентрации 100 мг/дм³ значительно увеличивало биопоглощение Pb в диапазоне от 0,25 мг/дм³ до 2,0 мг/дм³ Pb, а максимальный накопленный Pb в водорослях достигал 18,22 нг/105 клеток с наночастицами Al₂O₃ 100 мг/дм³ по сравнению с одним Pb при 2,0 мг/дм³ (12,53 нг/105 клеток). Результаты испытаний на токсичность и накопленный Pb в водорослях показывают, что, помимо общего содержания клеток Pb, биодоступность Pb внутри водорослей должна учитываться при оценке эффекта совместной токсичности.

Авторы исследования [173] оценивали совместное влияние наночастиц ZnO и хлорида цетилтриметиламмония на рост *Chlorella vulgaris* и изучили возможный механизм. Результаты показали, что антагонистический эффект наночастиц ZnO и цетилтриметиламмония (0,1, 0,2 и 0,3 мг/дм³) был обнаружен в связи с тем, что цетилтриметиламмоний останавливает расщепление наночастиц ZnO на ионы цинка (Zn²⁺). В присутствии цетилтриметиламмония цинк (включая нано-ZnO и высвобожденный Zn²⁺) демонстрировал более высокую адсорбцию на связанных внеклеточных полимерных веществах (В-EPS), но меньшую аккумуляцию в клетках водорослей. Более того, авторы прямо продемонстрировали, что наночастицы ZnO адсорбировались на водорослевой В-EPS и вводились в клетки водорослей с помощью просвечивающего электронного микроскопа в сочетании с энергодисперсионным рентгеновским излучением (ТЕМ-EDX). Следовательно, эти результаты свидетельствуют о том, что объединенная система наночастицы ZnO и цетилтриметиламмоний проявляет антагонистический эффект из-за ингибирования цетилтриметиламмония при растворении наночастиц ZnO и накоплении цинка в клетках водорослей.

Ряд оксидных НЧ, например, НЧ TiO₂ обладают высокой адсорбционной способностью. Это может приводить к потенцированию активности различных токсикантов под действием НЧ, выступающих для них в роли «проводников», усиливающих их проникновение через биологические барьеры. В частности, как было показано в работе [272] НЧ TiO₂ усиливали биоаккумуляцию кадмия гидробионтами. В ходе эксперимента в жабрах рыб выявлено совместное накопление титана и кадмия, причем уровень накопления последнего при добавлении в систему НЧ возрастал на 146%. Аналогичные данные получены и в отношении влияния наноразмерного диоксида титана на накопление мышьяка в организме рыб [228]. В другом исследовании [62] ультравысокодисперсные частицы TiO₂ усиливали поглощение

мононуклеарными фагоцитами человека бактериального липополисахарида, присоединённого к поверхности частиц через кальциевые мостики. Результатом было развитие мощного провоспалительного ответа, сопровождавшегося выделением значительных количеств опосредуемого каспазой ИЛ-1 β при одновременном подавлении выработки его антагониста TGF- β 1.

Представленные данные литературы свидетельствуют о том, что совместное поступление в организм некоторых видов НЧ и токсикантов традиционной природы способно приводить к потенцированию токсического действия последних, то есть является вероятным источником агрегированных рисков. Вместе с тем, систематическое исследование такого рода эффектов в отношении организмов теплокровных животных не проведено в полном объёме практически ни в одном случае. В связи с этим, изучение влияния металлооксидных НЧ (оксиды кремния, титана, алюминия) и фуллеренолов на токсическое действие приоритетных контаминантов пищевой продукции - ионов свинца и кадмия представляется актуальным и практически значимым.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Животные, состав экспериментальных рационов

Эксперименты проводили на крысах самцах линии Вистар, полученных из питомников лабораторных животных филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая) и «Пушино» (Московская область). Всего в исследованиях было использовано 279 крыс.

После поступления из питомника животные находились в карантине в течение не менее 10 суток.

Крыс содержали в условиях клиники лабораторных животных ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи» группами по 3-4 животных в прозрачных пластмассовых клетках из поликарбоната, в кондиционированном помещении при температуре 22-24°C со световым циклом 12 ч и кормили на протяжении всего эксперимента сбалансированным полусинтетическим рационом (ПР) на основе казеина. Доступ к корму и питьевой воде не ограничивали.

Состав ПР соответствовал требованиям МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». В состав сухого рациона входили (г(см³)/кг): крахмал кукурузный (635,0), казеин (200,0), масло растительное (подсолнечное) (50,0), лярд (50,0), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (20,0), сахароза высокоочищенная (12,60), кальций фосфорнокислый Ca₃(PO₄)₂ (17,5), калий лимоннокислый моногидрат C₆H₅O₇K₃× H₂O (7,7), натрий хлористый NaCl (2,59), калий сернокислый K₂SO₄ (1,82), рыбий жир (0,87), магния окись MgO (0,84), железо лимоннокислое C₆H₅O₇Fe (0,21), никотинамид (0,18), кальция пантотенат (0,18), марганец углекислый MnCO₃ (0,12), витамин E (токоферол 50 мг/см³) (0,1), цинк углекислый ZnCO₃ (0,05), тиамин гидрохлорид (0,045), рибофлавин (0,045), пиридоксид гидрохлорид (0,045), хромовокалиевые квасцы CrK(SO₄)₂×12H₂O (0,02), фолиевая кислота (0,018), витамин A (ретинол 100000 МЕ/см³) (0,01), витамин D (эргокальциферол 50000 МЕ/см³) (0,01), медь углекислая CuCO₃ (0,01), викасол (0,009), биотин (0,0009), йодистокислый калий KIO₃ (0,00035), селенистокислый натрий Na₂SeO₃ (0,00035), цианкобаламин (0,00013). Химический состав рациона, который, в основном, соответствовал AIN 93 [221] представлен в Таблице 3.

Таблица 3 – Состав полусинтетического рациона (на 100 г.)

№	Ингредиенты	Количество, г	Белок, г	Жир, г	Углеводы, г	Калорийность	
						ккал	%
1.	Крахмал кукурузный	63,50	0,63	-	54,96	222,38	58,05
2.	Казеин	20,00	16,16	0,30	-	67,37	17,58

3.	Масло подсолнечное	5,00	-	4,99	-	44,91	11,72
4.	Лярд	5,00	-	4,98	-	44,82	11,69
5.	Солевая смесь	3,50	-	-	-	-	-
6.	МКЦ	2,00	-	-	-	-	-
7.	Смесь в/р витаминов	0,90	-	-	0,90	3,60	0,90
8.	Смесь ж/р витаминов	0,10	-	0,10	-	-	-
	ИТОГО	100,00	16,79	10,37	55,86	383,08	99,94

2.2 Характеристика используемых материалов и реактивов

2.2.1 Наночастицы и наноматериалы

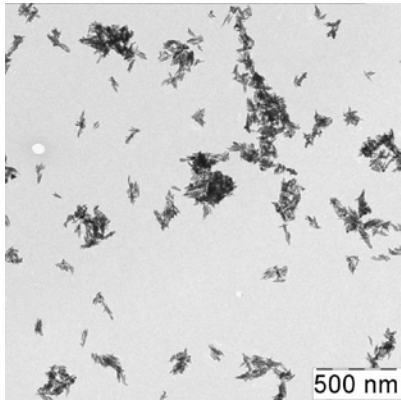
В экспериментах использовали НЧ диоксида титана (рутильной формы), диоксида кремния (220 м²/г и 300 м²/г), оксида алюминия и фуллерен C₆₀(ОН)₂₄.

Наночастицы диоксида титана. Применяли НЧ рутильной формы TiO₂ производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США – Германия) (далее- рутил), каталожный № 637262, М.м.=79,87 г/моль. Образец представлял собой лёгкий порошок чистого белого цвета, негигроскопичный, склонный к пылеобразованию, при растворении в воде дающий стойкую в течение не менее 3-5 минут суспензию молочно-белого цвета. Исследование образца методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) было проведено на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (зам. зав. кафедрой. д.ф.-м.н., профессор К.В. Шайтан).

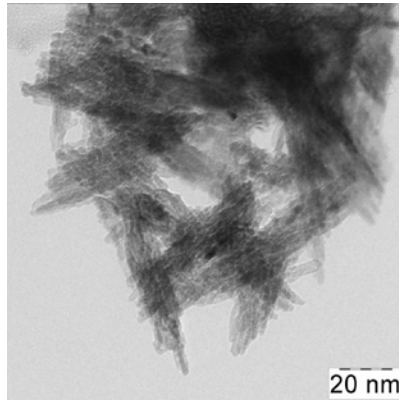
Как видно из представленных данных (Рисунок 1А-В), препарат содержит агрегаты наночастиц, представляющих собой стержневидные кристаллы диаметром 5-10 нм и длиной от 40 до 100 нм. Аспектное отношение (отношение максимального размера к минимальному) составляет для отдельных частиц от 8 до 20. Картина дифракции электронов с выбранной области показала, что частицы являются кристаллическими (Рисунок 1Д). Для того, чтобы доказать, что найденные частицы являются частицами диоксида титана, с области, показанной на рисунке 1З, был снят спектр характеристических потерь энергии электронов (ХПЭЭ). На полученном спектре (Рисунок 1Ж) отчётливо видны два пика с максимумами в области 464 и 469 эВ – характеристические пики для титана.

Наночастицы диоксида кремния (220 м²/г). Применяли стандартизованные НЧ диоксида кремния SiO₂ производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США), каталожный № 637238, М.м.= 60,08 г/моль, CAS 7631-86-9. Образец представлял собой лёгкий 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 изготовителя диаметр частиц

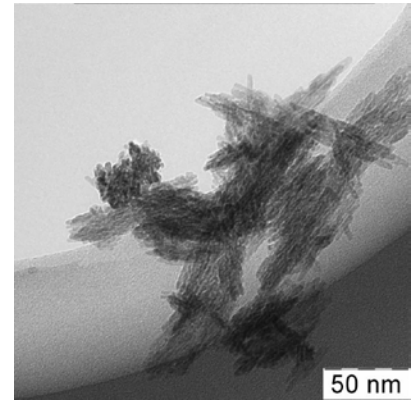
составил 10-20 нм. По данным электронномикроскопического исследования, проведенного на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (зам. зав. кафедрой. д.ф.-м.н., профессор К.В. Шайтан), в препарате содержались частично агрегированные НЧ SiO₂ неправильной формы со средним размером 10-20 нм (Рисунок 2).



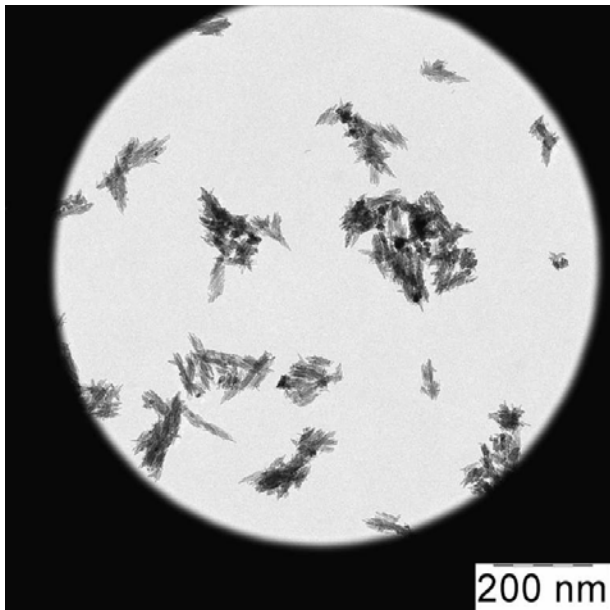
А



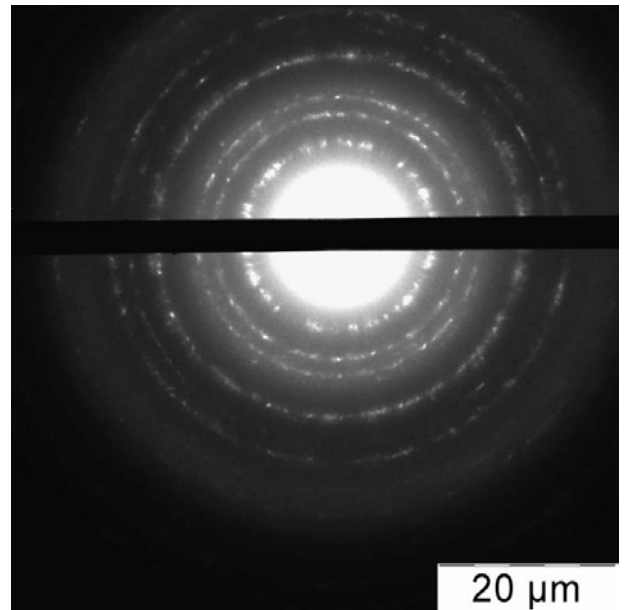
Б



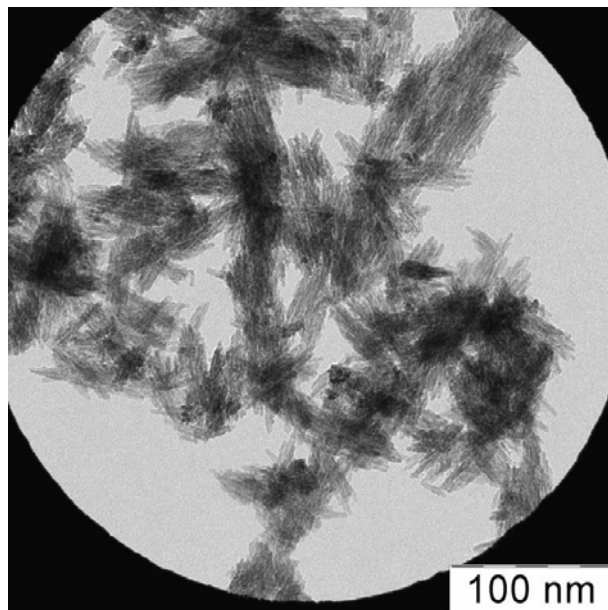
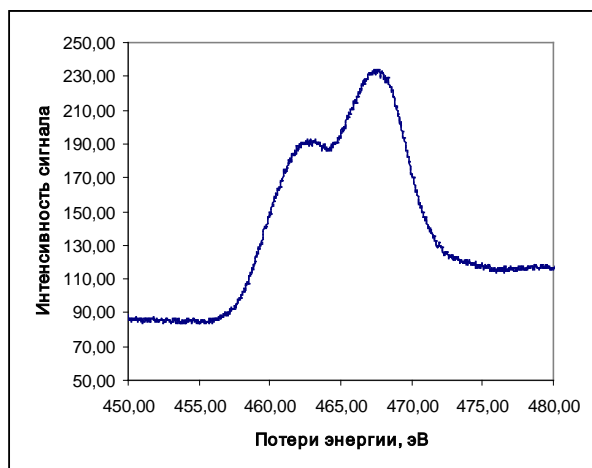
B



Г



Д



Ж

З

Рисунок 1 – ПЭМ – анализ образца «Рутил». А, Б, В – изображения найденных в образце наночастиц на различных увеличениях; Г – выбранная с помощью диафрагмы область с наночастицами, с которой была снята электронная дифракция; Д – картина электронной дифракции с области, показанной на рисунке Г; З – выбранная с помощью диафрагмы область с наночастицами, с которой был снят спектр СХПЭЭ; Ж – спектр ХПЭЭ для области с рисунка З.

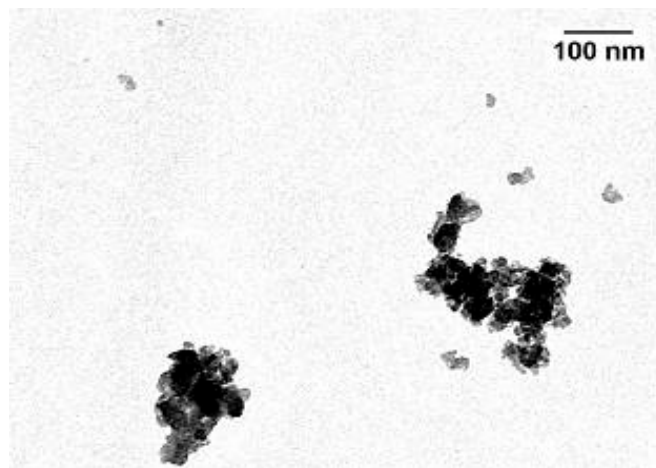


Рисунок 2 – Электронная микрофотография НЧ SiO₂ (220 м²/г)

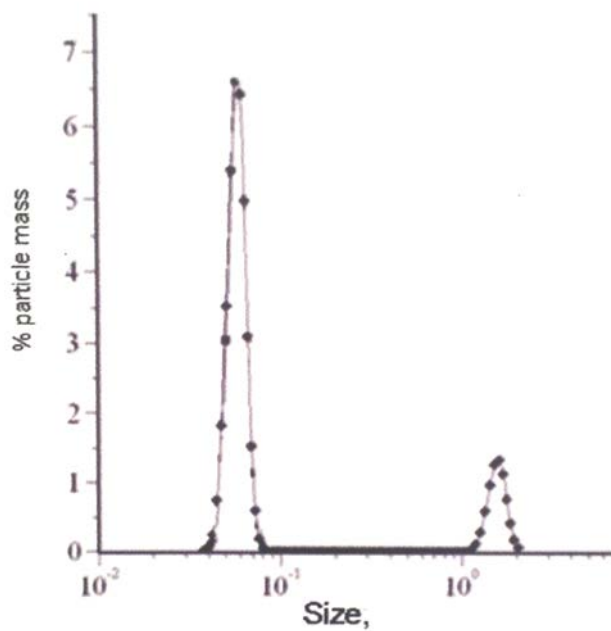
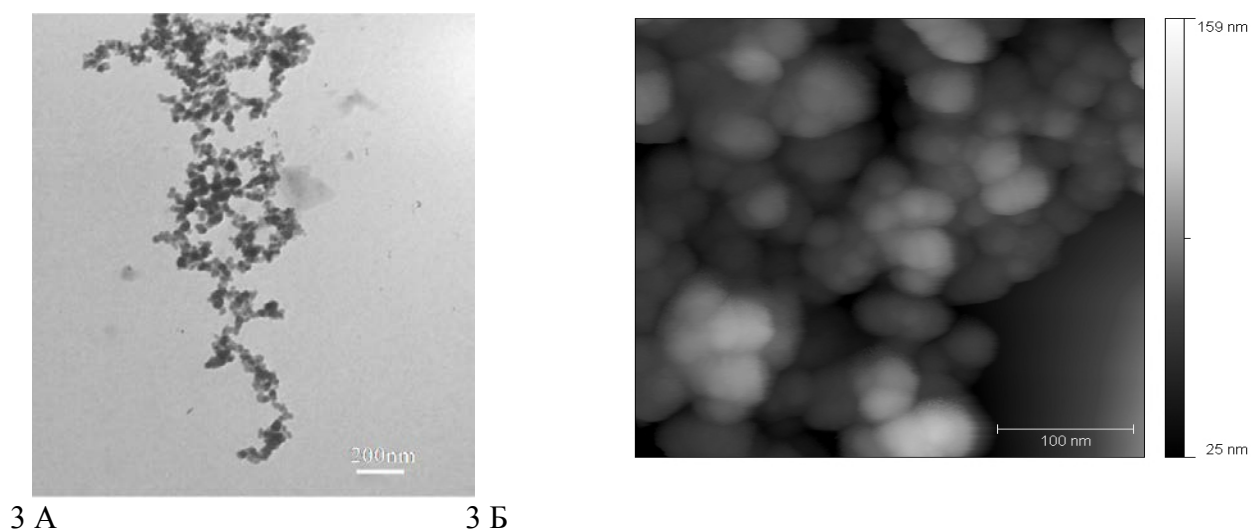
Наночастицы оксида алюминия. Использовали стандартизованные НЧ Al₂O₃ производства фирмы «Sigma-Aldrich» (Австрия), каталожный №544833, М.м.= 101,96 г/моль, CAS 1344-28-1. Образец представлял собой порошок белого цвета, нерастворимый в воде и органических растворителях. Согласно спецификации изготовителя диаметр частиц составил

<50 нм. Результаты исследования образца НЧ Al_2O_3 методами ТЭМ и атомно-силовой микроскопии (АСМ) показали, что частицы в исследованном образце имели по данным ТЭМ форму эллипсоидов, частично агрегированных в рыхлые кластеры, со средней величиной большой полуоси $6,3 \pm 3,3$ нм ($M \pm sd$) и малой - $5,0 \pm 2,6$ нм; по данным АСМ средний диаметр частиц равнялся $16,4 \pm 10,0$ нм. Характеристика размеров НЧ Al_2O_3 методами ТЭМ и АСМ проведена на кафедре биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова (зам. зав. кафедрой. д.ф.-м.н., профессор К.В.Шайтан).

Наночастицы диоксида кремния (300 м²/г). Использованный НЧ SiO_2 , полученный методом газофазного гидролиза химически чистого тетрахлорсилана, был приобретен в ООО «Силика» (Россия, Московская область, г. Долгопрудный) под торговой маркой «Аэросил 300». Индекс «300» в наименовании продукта означал удельную площадь поверхности в м²/г, определенную методом изотерм адсорбции инертных газов. В соответствии со спецификацией изготовителя продукция соответствовала ГОСТ 14922-77. По своим физическим свойствам продукт представлял собой рентгеноаморфный лёгкий белый порошок, дающий при диспергации ультразвуком в воде опалесцирующий бесцветный коллоидный раствор, стабильный в течение не менее 2 суток. По данным изготовителя частицы SiO_2 в продукте являлись не пористыми.

Исследование суспензии SiO_2 в концентрации 1 мкг/см³ методом ТЭМ было проведено в лаборатории иммунобиохимии ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (зав. лабораторией д.х.н., профессор Б.Б. Дзантиев). Как следует из полученных данных (Рисунок 3А), частицы на сеточке распределялись в основном в виде больших агрегатов, состоящих из первичных частиц размером от 5 до 100 нм, и очень небольшого количества отдельных частиц размером 5-20 нм. Метод АСМ показал на сканированных изображениях образцов суспензии, высушенных на подложке, присутствие НЧ, находящихся преимущественно в агрегированном состоянии (Рисунок 3Б). Агрегаты НЧ присутствовали на всех сканах с размером сканируемой области 20×20 мкм²; размеры агрегатов варьировали, достигая максимальной величины до 2 мкм в одном из измерений. Для всех агрегатов отмечено, что структурным элементом является частица с размерами менее 100 нм. Популяция НЧ в составе агрегатов была однородной по морфологии; состояла из сферических частиц с размерами от 20 до 60 нм.

Спектроакустическое исследование водной суспензии НЧ SiO_2 концентрацией 5% по массе, обработанной ультразвуком, выявило бимодальное распределение частиц по размерам с преобладанием фракции НЧ со средним размером 20-40 нм (Рисунок 3В). Исследование проведено в Метрологическом центре ОАО РОСНАНО к.ф.-м.н. Лошкаревым А.А.



3 В

Рисунок 3 – Анализ образца SiO₂. А – методом ТЭМ; Б – методом АСМ; В – спектроакустическое исследование.

Фуллеренол. В работе был использован препарат фуллеренола C₆₀(ОН)₂₄ высокой степени чистоты (около 98%). Согласно спецификации изготовителя (ЗАО «Фуллерен-Центр», г. Нижний Новгород, Россия), препарат получен путём гидроксирования фуллерена C₆₀ в растворе ароматического углеводорода под действием водного раствора щёлочи в присутствии катализатора и может содержать до нескольких процентов влаги по массе с возможной примесью этанола менее 0,1%. В инфракрасном спектре фуллеренола в области 4000 - 500 см⁻¹

проявляются полосы валентных (3430 см^{-1}) и деформационных (1390 см^{-1}) колебаний групп ОН, валентных колебаний групп С-О (1070 см^{-1}) и С=С (1600 см^{-1}). ^{13}C ЯМР-спектроскопия свидетельствует о наличии атомов углерода, связанных гидроксильными группами не менее чем 2 типов, и не связанных с гидроксильными группами. По данным изготовителя тетрагравиметрический анализ свидетельствует о потере массы 18,37% (при нагревании от 200 до $350\text{ }^{\circ}\text{C}$), что соответствует содержанию 36,74% гидроксильных групп по массе в молекуле фуллеренола. По этим данным формула фуллеренола отвечает $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ с возможным присутствием небольшого количества (до 1%) гомологов – фуллеренолов $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22}$ и $\text{C}_{60}(\text{OH})_{26}$.

2.2.2 Токсиканты традиционной степени дисперсности

Свинец уксуснокислых трехводный

В качестве модельного токсиканта традиционной степени дисперсности использовали свинец уксуснокислый трехводный х.ч. $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\times 3\text{H}_2\text{O}$ (далее- ацетат свинца), производства ООО «Хромресурс» (Россия), соответствующий ГОСТ 1027-67, М.м.=379,34 г/моль, CAS № 6080-56-4. Вещество со слабым запахом уксусной кислоты представляло собой бесцветные кристаллы, в массе белого цвета, легко растворимые в воде, гигроскопичные. В автоматизированной распределенной информационно-поисковой системе (АРИПС) «Опасные вещества» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, имеет регистрационный № ВТ-005126.

Хлорид кадмия 2,5-водный

В качестве модельного токсиканта традиционной степени дисперсности использовали хлорид кадмия 2,5-водный х.ч. $\text{CdCl}_2\times 2,5\text{H}_2\text{O}$ (далее - хлорид кадмия), производства ООО «Химмед» (Россия), соответствующий ГОСТ 4330-76, М.м.=228,34 г/моль, CAS № 7790-78-5. Вещество представляет собой бесцветные полупрозрачные кристаллы, легко растворимые в воде. В Автоматизированной распределенной информационно-поисковой системе (АРИПС) «Опасные вещества» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, имеет регистрационный № АТ-002466.

2.2.3 Прочие материалы и реактивы

В работе использовали следующие реактивы: стандартный образец состава водного раствора ионов свинца ГСО 7877-2000, производства Эколого-аналитической ассоциации «Экоаналитика», Россия; тюновый раствор «Tuning solution» Li, Y, Ce, Tl and Co, $10\text{ }\mu\text{g/L}$, матрица (фон) 2% HNO_3 , производства фирмы «Agilent Technologies», США; мульти-

элементный стандартный раствор Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn, концентрация каждого элемента- 10 мг/дм³; матрица (фон) 5% HNO₃, производства фирмы «Agilent Technologies», США; набор по определению 5-аминолевуленовой кислоты (5-АЛК) и порфибилиногена (ПБГ), производства фирмы «Biosystems S.A», Испания; этиловый спирт ректификат медицинский по ГОСТ Р 51652-2000. Остальные использованные реактивы (кислоты, соли и др.) имели квалификацию «химически чистый» («х.ч.») и «особо чистый» («о.с.ч.»). Дистиллированную воду получали с помощью аквадистиллятора «ДЭ-4-02», тип 2, производства фирмы «ЭМО», Россия. Для получения деионизованной воды использовали систему для очистки воды «Milli-Q Advantage A10 System» («Millipore Corporation», Франция).

2.3 Список использованного оборудования

При проведении исследований использовано следующее основное и вспомогательное оборудование:

- масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS серии 7700x (G 3281 A) («Agilent Technologies», Япония), оснащенный автосамплером («Agilent Technologies», Япония) и октапольной реакционной ячейкой (Octapole Reaction System, ORS);
- атомно-абсорбционный спектрометр «SOLAAR 969» с дейтериевой коррекцией («UNICAM», Великобритания);
- компрессор «Neuberger», тип PME 0438 воздушный, максимальное давление- 10 бар («UK LTD», Великобритания);
- анализатор размеров частиц «Nanotrack Wave» («Microtrac Inc», США);
- однолучевой спектрометр УФ – видимого диапазона «СФ-46» («ЛМОМО», Россия);
- планшетный иммуноферментный фотометр ЭФОС 9605 («Сапфир», Россия);
- электропечи сопротивления камерные лабораторные «СНОЛ 10/10» и «СНОЛ 10/11» («Опытный завод ВНИИЭТО», Россия);
- весы аналитические лабораторные электронные «Mettler Toledo AL104» с верхним пределом взвешивания 110 г 1-го класса точности по ГОСТ 24104-2001, цена деления 0,0001 г. («Mettler Toledo», Швейцария/США);
- весы лабораторные электронные «GX-6100» с верхним пределом взвешивания 6100 г и ценой деления 0,01 г. («A&D», Япония);
- иономер «Mettler Toledo Seven Easy» («Mettler Toledo», Швейцария/США);
- центрифуга «SIGMA 3-18K» («SIGMA Laborzentrifugen», Германия);

- микроволновая система минерализации проб под давлением «TOP WAVE» (фирма «Analytic Jena AG», Германия);
- система дистилляции и очистки кислот «SubPUR/DuoPUR» («MILESTONE», Италия);
- сосуды высокого давления, изготовленные из тефлона (TFM), PM40 («Analytik Jena AG», Германия);
- УЗ-ванна VGT-1000A, мощность 40 Вт, рабочая частота 40 кГц («NIKSY», Китай);
- УЗ-ванна «Сапфир» объем 12 л, мощность 550 Вт, рабочая частота 35 кГц (ЗАО «ПКФ Сапфир», Россия);
- персональный вортекс BioVortexV1 Plus, диапазон оборотов 250-3000 об/мин («BIOSAN», Латвия);
- устройство перемешивающее «ПЭ-6410М» (ЗАО НПО «ЭКРОС», Россия);
- магнитная мешалка «ES-6120» с подогревом, скорость вращения 100-1700 об/мин (ЗАО НПО «ЭКРОС», Россия);
- погружной УЗ процессор «Ultrasonic processor CP 130» мощность 130 Вт, частота 20 кГц («Cole-Parmer», США).

Все применявшееся в ходе исследования испытательное оборудование, а также средства измерений прошли метрологическую поверку в установленном порядке.

2.4 Схемы экспериментальных моделей, использованные в биологических экспериментах

Дизайны токсикологических экспериментов были разработаны в соответствии с МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». Воспроизведение модели хронической свинцовой интоксикации осуществляли согласно патенту Российской Федерации №2286607 «Способ моделирования хронической токсической нефропатии». Доза Cd была определена на основании экспериментов, ранее проведенных на базе ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (лаборатория пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий). Условия содержания и работы с животными соответствовали «Правилам лабораторной практики» (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»).

2.4.1 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц диоксида титана

Исследование проведено на 26 крысах исходной массой тела 140 ± 4 г ($M \pm m$). Животные были разделены на 3 группы по 8-9 крыс в каждой. Крысам на протяжении всего эксперимента ежедневно в фиксированное время внутрижелудочно вводили растворы ацетата свинца и

дисперсию НЧ TiO₂. Вводимые дозы ацетата свинца и НЧ TiO₂ по группам животных представлены в Таблице 4.

В ходе эксперимента крыс всех групп взвешивали на электронных весах с точностью ± 0,5 г. и оценивали динамику прироста массы тела. Продолжительность эксперимента составила 23 суток.

Интегральные показатели (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстяного покрова, потребление корма) изучали на протяжении всего эксперимента.

Таблица 4 – Схема 23-суточного эксперимента со свинцом и НЧ TiO₂

Группы животных	Доза ацетата свинца, мг/кг массы тела/сутки (в пересчете на свинец)	Доза НЧ TiO ₂ , мг/кг массы тела/сутки
1 (контроль Pb)	20	0
2	20	1
3	20	100

За 12 часов до выведения из эксперимента у животных забирали всю пищу, доступ к воде не ограничивали. Весь инструмент и используемую посуду стерилизовали в течение 12-часов в 96% растворе этилового спирта.

На 24-е сутки животных обескровливали из нижней полой вены под ингаляционной анестезией диэтиловым эфиром «для наркоза» (CAS 60-29-7, C₄H₁₀O, ФСП 42-0518-5003-04). Забор крови и биологических образцов проводили согласно требованиям МУ 1.2.2745-10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных». После вскрытия оценивали абсолютную и относительную массу внутренних органов (печень, почки, сердце, легкие, селезенка, надпочечники, семенники, тимус, головной мозг). Отбирали цельную кровь для определения концентрации гемоглобина и органы (печень, почки, селезенка, семенники, головной мозг) для определения содержания свинца методом атомно-абсорбционной спектроскопии с дейтериевой коррекцией на приборе «SOLAAR 969» («UNICAM», Великобритания).

2.4.2 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц диоксида кремния (220 м²/г)

Исследование проведено на 27 крысах исходной массой тела 80±8 г (M±m). Животные были разделены на 3 группы по 9 крыс в каждой. Животным на протяжении всего эксперимента ежедневно в фиксированное время внутрижелудочно вводили растворы ацетата свинца и

дисперсию НЧ SiO₂ (220 м²/г). Вводимые дозы ацетата свинца и НЧ SiO₂ (220 м²/г) по группам животных представлены в Таблице 5. Продолжительность эксперимента составила 21 сутки.

Таблица 5 – Схема 21-суточного эксперимента со свинцом и НЧ SiO₂ (220 м²/г)

Группы животных	Доза ацетата свинца, мг/кг массы тела/сутки (в пересчете на свинец)	Доза НЧ SiO ₂ (220 м ² /г), мг/кг массы тела/сутки
1 (контроль Pb)	20	0
2	20	1
3	20	100

Перечень изучаемых показателей у животных показателей совпадал с приведенным в п. 3.4.1. Кроме того, на 20-е сутки эксперимента проводили сбор суточной мочи, в которой определяли 5-аминолевуленовую кислоту (5-АЛК) спектрометрическим методом с использованием наборов фирмы «Biosystems S.A» (Испания).

2.4.3 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц диоксида кремния (300 м²/г)

Исследование проведено на 62 крысах исходной массой тела 135 г (M±m). Животные были разделены на 6 групп по 10-11 крыс в каждой. Животным 1-й (контроль H₂O) группы вводили внутривенно через зонд дистиллированную воду. Крысы 2-й и 3-й групп получали дисперсию НЧ SiO₂ (300 м²/г) в дозах 1 и 100 мг/кг массы тела соответственно. Крысам 4 группы (контроль Pb) вводили внутривенно раствор ацетата свинца в дозе 20 мг/кг массы тела (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 SiO₂ (300 м²/г) в дозах, соответственно, 1 и 100 мг/кг массы тела. Внутривенные введения указанных препаратов осуществляли ежедневно, в фиксированное время. Продолжительность эксперимента составила 22 суток.

Вводимые дозы ацетата свинца и НЧ SiO₂ (300 м²/г) по группам животных представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Схема 22-суточного эксперимента со свинцом и НЧ SiO₂ (300 м²/г)

Группы животных	Доза ацетата свинца, мг/кг массы тела/сутки (в пересчете на свинец)	Доза НЧ SiO ₂ (300 м ² /г), мг/кг массы тела/сутки
1 (контроль H ₂ O)	0	0
2	0	1
3	0	100

4 (контроль Pb)	20	0
5	20	1
6	20	100

В ходе эксперимента крыс всех групп взвешивали на электронных весах с точностью $\pm 0,5$ г. и оценивали динамику прироста массы тела. Интегральные показатели (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстяного покрова, потребление корма) изучали на протяжении всего эксперимента. На 20-е сутки эксперимента проводили сбор суточной мочи, в которой определяли 5-аминолевуленовую кислоту (5-АЛК) и порфибилиноген (ПБГ) спектрометрическим методом с использованием наборов фирмы «Biosystems S.A» (Испания). На 23-и сутки животных обескровливали из нижней полой вены под ингаляционной анестезией диэтиловым эфиром «для наркоза». После вскрытия оценивали абсолютную и относительную массу внутренних органов (печень, почки, сердце, легкие, селезенка, надпочечники, семенники, тимус, головной мозг). Отбирали цельную кровь для определения концентрации гемоглобина и органы (печень, почки, головной мозг) для определения содержания свинца методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ICP-MS (7700x) («Agilent Technologies», Япония).

2.4.4 Эксперимент по изучению совместного поступления свинца и наночастиц оксида алюминия

Исследование проведено 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 на протяжении всего эксперимента внутрижелудочно дистиллированную воду. Животные группы 2 (контроль Pb) получали на протяжении всего эксперимента внутрижелудочно 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. Внутрижелудочные введения указанных препаратов осуществляли ежедневно, в фиксированное время. Продолжительность эксперимента составила 22 суток.

Вводимые дозы ацетата свинца и НЧ Al_2O_3 по группам животных представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Схема 22-суточного эксперимента со свинцом и НЧ Al_2O_3

Группы животных	Доза ацетата свинца, мг/кг массы тела/сутки (в пересчете на свинец)	Доза НЧ Al_2O_3 , мг/кг массы тела/сутки
1 (контроль H_2O)	0	0

2 (контроль Pb)	20	0
3	20	1
4	20	100

В ходе эксперимента крыс всех групп взвешивали на электронных весах с точностью $\pm 0,5$ г. и оценивали динамику прироста массы тела. Интегральные показатели (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстяного покрова, потребление корма) изучали на протяжении всего эксперимента. На 20-е сутки эксперимента проводили сбор суточной мочи, в которой определяли 5-аминолевуленовую кислоту (5-АЛК) и порфобилиноген (ПБГ) спектрометрическим методом с использованием наборов фирмы «Biosystems S.A» (Испания). На 23-и сутки животных обескровливали из нижней полой вены под ингаляционной анестезией диэтиловым эфиром «для наркоза». После вскрытия оценивали абсолютную и относительную массу внутренних органов (печень, почки, сердце, легкие, селезенка, надпочечники, семенники, тимус, головной мозг). Отбирали цельную кровь для определения концентрации гемоглобина и органы (печень, почки, селезенка, семенники, головной мозг) для определения содержания свинца методом атомно-абсорбционной спектрометрии с дейтериевой коррекцией на приборе «SOLAAR 969» («UNICAM», Великобритания)

2.4.5 Эксперимент по изучению совместного поступления кадмия и наноматериалов (наночастицы диоксида титана, диоксида кремния (300 м²/г) и фуллеренол)

Исследование проведено на 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 H₂O) вводили внутривентрикулярно через зонд дистиллированную воду. Крысы 2-й группы (контроль Cd) получали внутривентрикулярно раствор хлорида кадмия в дозе 1 мг/кг массы тела (в пересчете на кадмий) в целях воспроизведения модели кадмиевой нефропатии. Животные оставшихся 6-ти опытных групп на фоне введения хлорида кадмия получали исследуемые наноматериалы в дозах, указанных в Таблице 8. Внутривентрикулярные введения указанных препаратов осуществляли ежедневно, в фиксированное время. Продолжительность эксперимента составила 28 суток.

Таблица 8 – Схема 28-суточного эксперимента с кадмием и НЧ TiO₂ (рутил), НЧ SiO₂ (300 м²/г) и фуллеренолом C₆₀(OH)₂₄

Группы животных	Доза CdCl ₂ , мг/кг массы тела/сутки (в пересчете на Cd)	Доза НЧ TiO ₂ (рутил), мг/кг массы тела/сутки	Доза НЧ SiO ₂ (300 м ² /г), мг/кг массы тела/сутки	Доза C ₆₀ (OH) ₂₄ , мг/кг массы тела/сутки
1 (H ₂ O)	0	0	0	0

2 (Cd)	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

В ходе эксперимента крыс всех групп взвешивали на электронных весах с точностью $\pm 0,5$ г. и оценивали динамику прироста массы тела. Интегральные показатели (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстяного покрова, потребление корма) изучали на протяжении всего эксперимента. На 29-и сутки животных обескровливали из нижней полой вены под ингаляционной анестезией диэтиловым эфиром «для наркоза». После вскрытия оценивали абсолютную и относительную массу внутренних органов (печень, почки, сердце, легкие, селезенка, надпочечники, семенники, тимус, головной мозг). Методом ИСП-МС определяли содержание кадмия и других элементов в органах (печень, почки, головной мозг) животных на приборе ICP-MS (7700x) («Agilent Technologies», Япония).

2.5 Методы отбора субстратов и пробоподготовки биологических образцов

Отбор органов у лабораторных животных осуществляли в соответствии с МУ 1.2.2745-10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных». Сбор суточной мочи проводили на 20-ые сутки опыта, поместив животных на 24 часа в обменные клетки, без доступа к корму. Доступ к питьевой воде не ограничивали. Животных по окончании каждого эксперимента подвергали ингаляционной анестезии эфиром, вскрывали брюшную полость и обескровливали из нижней полой вены. Кровь собирали дробно, порциями на антикоагулянт (0,1% по массе К₃ЭДТА) для определения¹ гематологических показателей и в стерильную сухую пробирку для получения сыворотки. Кроме этого, часть крови собирали для определения концентрации гемоглобина. Затем у крыс выделяли внутренние органы (печень, почки, селезенку, сердце, семенники, тимус, легкие, надпочечники, головной мозг), определяли их абсолютную массу с точностью $\pm 0,01$ г на электронных лабораторных весах и рассчитывали относительную массу в % от массы тела. Печень, почки, селезенку, семенники, головной мозг отбирали для количественного определения содержания элементов методами атомно-абсорбционной спектрометрии и масс-

¹ Выполнялось в лаборатории иммунологии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (зав. лабораторией д.м.н., проф. Ханферьян Р.А.) в рамках исследований по теме НИР № 140 «Разработка критериев и определение биомаркеров воздействия искусственных наночастиц на организм при пероральном пути поступления»

спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. После отбора образцы органов немедленно замораживали в морозильной камере и хранили до анализа при -20°C .

2.6 Аналитические методы исследований

2.6.1 Спектрометрические методы

Определение 5-аминолевуленовой кислоты

Воздействие свинца на организм проявляется в нарушении порфиринового обмена вследствие ингибирования активности ферментов дегидразы 5-аминолевулиновой кислоты и гемсинтазы (см. раздел 2.1), в результате чего возникает метаболический блок с накоплением и последующим увеличением экскреции с мочой промежуточных метаболитов синтеза гема – 5-аминолевуленовой кислоты (5-АЛК) и копропорфирина (КП), а также повышение уровня протопорфирина (ПП) эритроцитов, что относится к наиболее ранним, достоверным и специфическим показателям интоксикации.

На 20-е сутки экспериментов по изучению сочетанного воздействия свинца и наноматериалов проводили сбор суточной мочи, в которой определяли 5-АЛК и порфобилиногена (ПБГ) спектрометрическим методом с использованием наборов фирмы «Biosystems S.A» (Испания).

Определение гемоглобина

В каждом эксперименте у животных опытных и контрольных групп определяли в цельной крови концентрацию гемоглобина гемиглобинцианидным методом с помощью наборов реагентов «ЭКОлаб-Гемоглобин», производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия.

2.6.2 Динамическое рассеяние света

Динамическое рассеяние света (ДРС, синонимы: фотонная корреляционная спектроскопия, динамическое лазерное светорассеяние, квазиупругое рассеяние света) – это метод измерения размеров частиц, основанный на определении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Из коэффициента диффузии по уравнению Стокса-Эйнштейна рассчитывается эффективный радиус/диаметр частиц. Результаты, получаемые методом ДРС, бывают, обычно, несколько завышены по сравнению с данными морфологических методов (ТЭМ, АСМ) ввиду того, что при определении величины эффективного радиуса/диаметра частицы в него включается толщина прочно связанной с частицей сольватной оболочки из молекул растворителя и адсорбированных примесей.

Измерения были проведены на лазерном анализаторе частиц «Nanotrack Wave», снабженным несъёмной тefлоновой ячейкой с длиной оптического пути 2×1 см и термодатчиком, в следующих условиях: дисперсионная среда - вода (показатель преломления, $n=1,333$); форма частиц - неправильная (irregular), частицы непрозрачные, число повторов измерений - 3, анализ распределения - по числу частиц (number), длина волны лазера - 780 нм, температура 22-25 °С (295-298 К). Величину вязкости (η) дисперсионной среды при температуре измерений определяли методом линейной интерполяции по табличным значениям вязкости воды при 20 и 30°С (293-303 К). Управление прибором и расчёт распределения частиц по величине эффективного диаметра осуществляли с использованием программного комплекса Nanotrac FLEX, функционирующего в программной среде Windows 7.

Перед проведением измерений водные суспензии наноматериалов в концентрации 0,1-1,0% по массе обрабатывали ультразвуком при частоте 44 кГц, мощности 1-2 Вт/см³, температуре 0-2°С (охлаждение льдом) в течение 5-10 минут.

2.6.3 Атомно-абсорбционная спектроскопия

ААС представляет собой метод количественного элементного анализа по атомным спектрам поглощения (абсорбции). Исследование включает стадии подготовки проб методом сухой минерализации и анализа проб, вводимых в виде раствора в воздушно-ацетиленовое пламя, на атомно-абсорбционном спектрометре.

Подготовку посуды, минерализацию проб, приготовление калибровочных и рабочих растворов, а также расчёт концентрации элементов в образце проводили согласно ГОСТ 26929-94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов» и ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов».

Подготовку прибора к работе, его включение, юстировку и выведение на рабочий режим осуществляли по прилагаемым к спектрометру техническим инструкциям.

2.6.4 Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

Метод ИСП-МС комбинирует использование индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионов с квадрупольным масс-спектрометром, выступающим в роли масс-анализатора (фильтра) и дискретно-диодным детектором, который используется для регистрации отдельных ионов и их потоков. Индуктивно связанная плазма, поддерживаемая в специальной горелке, способна эффективно возбуждать однозарядные ионы из атомов вводимого образца. Далее ионы фокусируются ионно-оптической системой и попадают в анализатор масс-спектрометра, где разделяются по отношению массы к заряду (m/z). Ионный поток

регистрируется детектором. Через масс-спектрометр в каждый момент времени пропускаются ионы со строго определенным m/z , которые затем попадают в детектор для количественной регистрации. Число соударений за единицу времени пропорционально количеству атомов каждого определяемого изотопа в исходном образце.

В работе использовали масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS серии 7700х, снабженный расположенной перед квадруполом масс-анализатора октопольной реакционной системой (Octopole Reaction System, ORS), которая позволяет избежать возникновения в ходе ионизации интерферирующих полиатомных ионов путем их избирательного разрушения в результате столкновений с нейтральными атомами реакционного газа (гелия). Помимо удаления мешающих анализу полиатомных ионов, ORS обеспечивает динамическое выделение узкого диапазона пропускания определяемых ионов и препятствует продвижению паразитных продуктов реакций к квадруполу масс-анализатора. В результате, ORS осуществляет эффективную фильтрацию полиатомных ионов, уменьшает общий фон и увеличивает стабильность сигнала.

Для минерализации проб биологических образцов применяли метод микроволнового разложения (кислотного разложения, «мокрого» озоления), который обеспечивает по сравнению с описанным выше методом сухого озоления следующие преимущества: высокую производительность, полное окисление органической матрицы практически любых биосубстратов в результате проведения реакции в жидкой фазе при высокой температуре (180-200°C) под давлением (40-50 бар) и существенное уменьшение потерь летучих элементов при разложении (ввиду проведения реакции в закрытом объёме).

Использовали микроволновую систему минерализации проб «TOP WAVE» и сосуды высокого давления РМ40, изготовленные из тефлона (TFM), производства фирмы «Analytik Jena AG», Германия.

После механического измельчения образцов органов в блендере, полученные гомогенаты тщательно перемешивали, отбирали навеску примерно по 500 мг и помещали в сосуд высокого давления. Добавляли 5 см³ концентрированной HNO₃ (квалификации о.с.ч или перегнанной в системе перегонки кислот), закрывали блокирующими крышками и оставляли на ночь под тягой. На следующие сутки добавляли 1 см³ концентрированной перекиси водорода (х.ч.), плотно закрывали сосуды блокирующими крышками, энергично встряхивали закрытые сосуды и производили минерализацию при параметрах, указанных в Таблице 9.

Таблица 9 – Параметры минерализации проб

Температура магнетрона, °С	120
Мощность микроволн, %	99

Температура в автоклаве, °С	200
Давление в автоклаве, бар	40
Время удерживания, мин	10

После проведения разложения сосуда встряхивали для перемешивания содержимого и приоткрывали блокирующую крышку для уравнивания давления. Пробы после отхождения окислов азота представляли собой бесцветные или желтоватые прозрачные растворы, без нерастворившихся частиц на дне и на стенках. Растворенную пробу количественно переносили в мерную полиэтиленовую пробирку, доводили до объема 50 см³ раствором 2% HNO₃, закрывали и перемешивали.

Приготовление рабочих растворов:

В качестве калибровочного раствора использовали тьюновый раствор «Tuning solution Li, Y, Ce, Tl and Co, 10 µg/L», матрицу (фоновый раствор) 2% HNO₃, производства фирмы «Agilent Technologies», США, а для построения градуировочных графиков элементов – мультиэлементный стандартный раствор Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn, с концентрацией каждого элемента 10 мг/дм³ и матрицу (фоновый раствор) 5% HNO₃, производства фирмы «Agilent Technologies», США.

Готовили 7 стандартных растворов сравнения с концентрацией элементов 0,1 мкг/см³, 1 мкг/см³, 10 мкг/см³, 25 мкг/см³, 100 мкг/см³, 500 мкг/см³ и 1000 мкг/см³ путем разбавления основного мультиэлементного раствора в 1% HNO₃. Бланк представлял собой раствор 1% HNO₃. Градуировочные графики считали пригодными для использования при коэффициенте корреляции R≥0,996.

Подготовка масс-спектрометра к работе и условия измерения

Квадрупольный масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой ICP-MS готовили к работе в соответствии с руководством пользователя (инструкцией по эксплуатации). Необходимые режимы работы устанавливали в соответствии с рекомендациями производителя. Условия анализа и рабочие параметры прибора были следующими:

- скорость потока плазменного газа (аргона) 16,0 дм³/мин;
- скорость потока вспомогательного газа (гелия) 0,04 дм³/мин;
- скорость потока газа-носителя 1,07 дм³/мин;
- распылитель - тип Micromist;
- 2-проходная кварцевая распылительная камера - температура распыления 2°C;
- система ввода образца, скорость перистальтического насоса 0,5 см³/мин;
- количество точек на ед. массы- 3.

Первичную обработку сигналов и расчет концентраций проводили с помощью программного обеспечения автоматически, на основании параметров используемого метода и данных проведенной градуировки.

Аналитические сигналы обрабатывали программным обеспечением масс-спектрометра с помощью градуировочных графиков, построенных методом наименьших квадратов по модели линейной регрессии с учетом коррекции фона и сигнала от внутренних стандартных образцов. Результат определения представляли как среднее из нескольких (не менее двух) параллельных измерений анализируемого образца. Обработку результатов измерений проводили в соответствии с ГОСТ Р 8.736-2011 «Государственная система обеспечения единства измерений. Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения». Результаты измерений распечатывали и сохраняли в виде файла на электронном носителе.

Расчёт концентрации элемента в образце проводили по формуле:

$$X = [(C \times V \times K) / M], \text{ где}$$

X- искомое содержание элемента в биопробе, мкг/г;

C- концентрация элемента, определённая по калибровочному графику, мкг/дм³, скорректированная на величину сигнала контрольной пробы (бланка), не содержащей образца;

V - объем пробы после минерализации, см³;

K – коэффициент разведения пробы;

M - навеска пробы, г.

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

Для определения адсорбционной способности трех видов НМ 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 среду, характерную для тонкой кишки.

Приготовление буферного раствора и растворов ионов Pb и Cd

Буферный раствор 0,05 М NaHCO₃, pH 8,0. В мерную колбу на 1000 см³ вносили 200 см³ деионизованной воды, растворяли 4,2 г NaHCO₃ и доводили до метки деионизованной водой. При необходимости доводили pH до 8,0 с помощью HNO₃.

Стандартный раствор ионов свинца с концентрацией 1000 мкмоль/см³. В мерную пробирку на 15 см³ вносили 3,10 см³ ГСО водного раствора ионов свинца (концентрация ионов свинца 1 мг/см³=4,8309 ммоль/дм³) и доводили до метки буферным раствором. Растворы

концентрацией 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 и 3,91 мкмоль/дм³ готовили последовательным разведением основного стандартного раствора.

Стандартный раствор ионов кадмия с концентрацией 1000 мкмоль/см³. В мерную пробирку на 15 см³ вносили 1,68 см³ ГСО водного раствора ионов кадмия (концентрация кадмия 1 мг/см³=8,9285 ммоль/дм³) и доводили до метки буферным раствором. Растворы концентрацией 200, 160, 120, 80, 40 и 20 мкмоль/дм³ готовили последовательным разведением основного стандартного раствора.

Приготовление растворов НЧ и НМ

После растворения НЧ SiO₂ (300 м²/г), НЧ TiO₂ и НЧ Al₂O₃ в буферном растворе полученные суспензии обрабатывали на ультразвуковом погружном диспергаторе при мощности 2 Вт/см³ в течение 5 минут.

Далее делали серию разведений как представлено в Таблицах 10-11 так, чтобы конечный раствор имел объем 6 см³ (3 см³ раствора ионов металла+3 см³ суспензии НЧ).

Таблица 10 – Концентрация растворов свинца для инкубации

Концентрация НЧ, 1 мг/см ³	Исходная концентрация Pb ²⁺ , 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 (300 м ² /г)	250,0	125,0	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9

Таблица 11 – Концентрация растворов кадмия для инкубации

Концентрация НМ, 1 мг/см ³	Исходная концентрация Cd ²⁺ , 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 (300 м ² /г)	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0	10,0

Инкубация

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 автоматической пипеткой отбирали надосадочную жидкость (5 см³) и определяли в ней содержание свинца и кадмия.

Определение содержание свинца и кадмия

В надосадочной жидкости проводили количественное определение содержания свинца и кадмия методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе ICP-MS (7700x) («Agilent Technologies», Япония).

2.8 Методы статистической обработки экспериментальных данных

Статистический анализ данных выполняли с использованием компьютерной программы SPSS (версии 16.0, 18.0, 20.0) (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 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 наличия свинца/кадмия и наличия наночастиц с помощью теста на остаточную дисперсию ANOVA). Различия между группами животных признавали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика исследуемых наноматериалов методом динамического рассеяния света

3.1.1 Наночастицы диоксида титана

Анализ размера частиц НЧ TiO_2 в водной суспензии концентрацией 1% по массе, обработанной ультразвуком, показал, что в препарате были представлены две размерные фракции частиц со среднечисловым эффективным гидродинамическим диаметром 44 нм (51,5%) и 103,6 нм (48,5%). 90-й перцентиль размера составил 129,3 нм (Рисунок 4). 87% от общего числа частиц имели эффективный гидродинамический диаметр менее 100 нм.

Таким образом, подавляющее большинство частиц образца находится в нанодиапазоне размеров и данный препарат диоксида титана следует рассматривать как наноматериал.

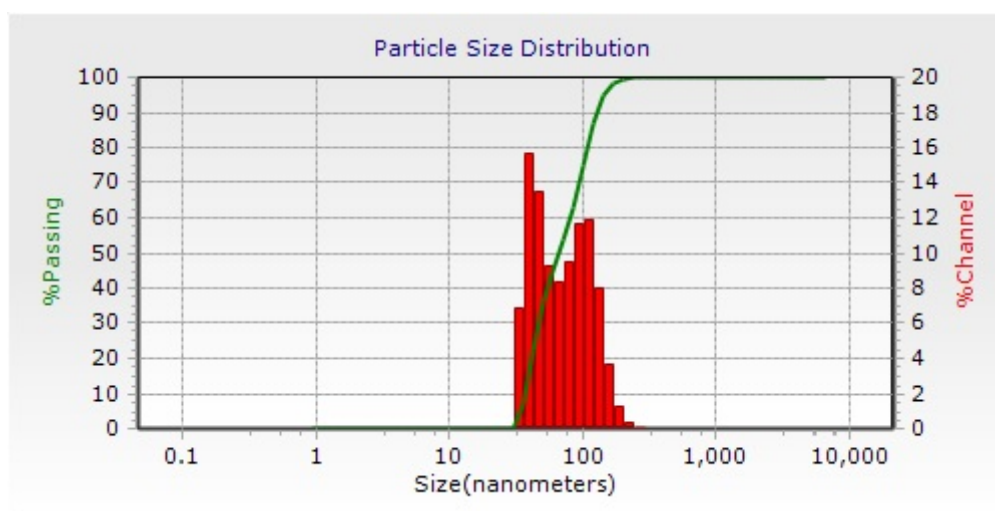


Рисунок 4 – Распределение частиц в препарате НЧ TiO_2 . Ось абсцисс - размер частиц, нм; ось ординат: слева – доля частиц с размером не менее данного, % (кривая); справа – доля частиц в интервале размеров, % (гистограмма)

3.1.2 Наночастицы диоксида титана (220 $\text{м}^2/\text{г}$)

Анализ размеров частиц был проведен методом электронномикроскопического исследования на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (зам. зав. кафедрой. д.ф.-м.н., профессор К.В. Шайтан). По результатам анализа в препарате содержались частично агрегированные НЧ SiO_2 неправильной формы со средним размером 10-20 нм (см. раздел 3.2.1).

3.1.3 Наночастицы диоксида титана (300 м²/г)

Анализ размера частиц водной суспензии НЧ SiO₂ (300 м²/г), в концентрации 1% по массе показал, что в препарате присутствовала единственная размерная фракция НЧ со среднечисловым гидродинамическим диаметром 30,2 нм, 90-й перцентиль размера – 60,2 нм (Рисунок 5). Число частиц с размером более 100 нм составляло не более 4%. В соответствии с этими данными, используемый препарат НЧ SiO₂ (300 м²/г) является наноматериалом, что подтверждается также данными исследования методами ТЭМ и АСМ (см. раздел 3.2.1).

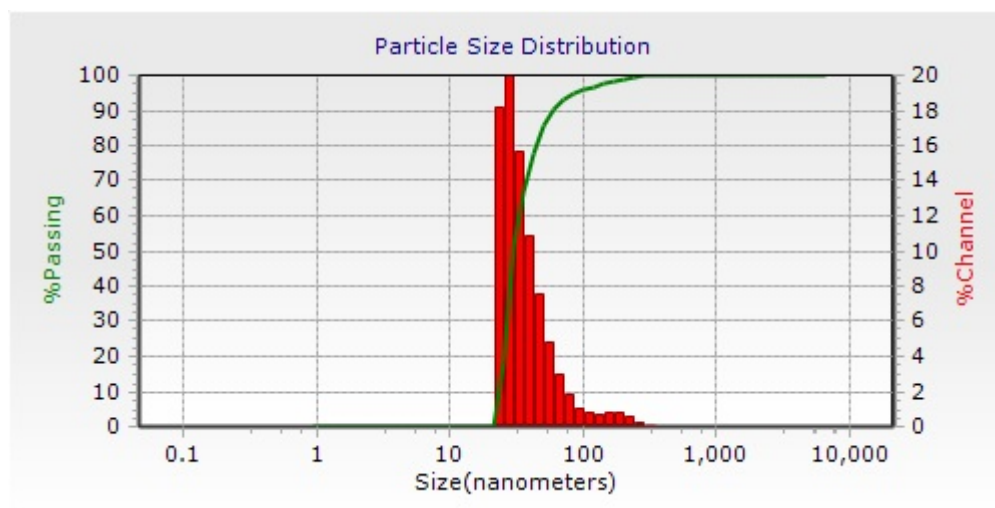


Рисунок 5 – Распределение частиц НЧ SiO₂ (300 м²/г). Ось абсцисс - размер частиц, нм; ось ординат: слева – доля частиц с размером не менее данного, % (кривая); справа – доля частиц в интервале размеров, % (гистограмма)

3.1.4 Наночастицы оксида алюминия

Анализ размера частиц образца наноразмерного Al₂O₃ в водной суспензии концентрацией 1% по массе показал, что в препарате была представлена одна размерная фракция частиц со среднечисловым эффективным гидродинамическим диаметром 63,7 нм, 90-й перцентиль размера – 145 нм (Рисунок 6). 68,89 % от общего числа частиц имели эффективный гидродинамический диаметр менее 100 нм. Таким образом, большая часть частиц оксида алюминия в образце находится в нанодиапазоне размеров и данный препарат Al₂O₃ действительно является наноматериалом, что подтверждается также данными анализа методом ТЭМ (см. раздел 3.2.1).

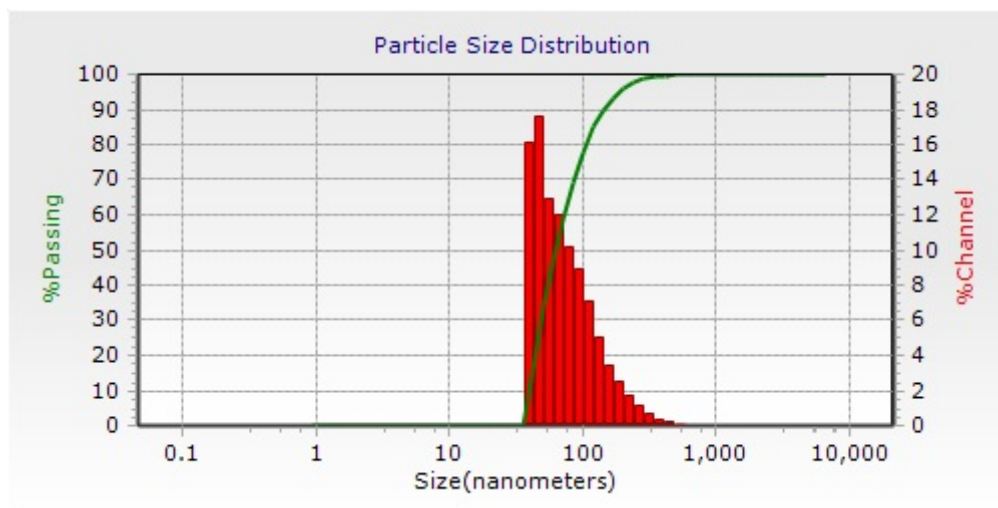


Рисунок 6 – Распределение частиц в препарате НЧ Al_2O_3 . Ось абсцисс - размер частиц, нм; ось ординат: слева – доля частиц с размером не менее данного, % (кривая); справа – доля частиц в интервале размеров, % (гистограмма)

3.1.5 Фуллеренол

Анализ размера частиц фуллеренола в концентрации 1% по массе показал, что в препарате преобладала фракция частиц со среднечисловым гидродинамическим диаметром 73,1 нм, 90-й перцентиль размера – 221,9 нм (Рисунок 7). Поскольку, диаметр единичной молекулы фуллеренола (с учётом размера сольватной оболочки) составляет около 0,9 нм, из полученного результата следует, что фуллеренол в водном растворе значительно агрегирован; тем не менее, большая часть этих агрегатов находится в нанодиапазоне размеров.

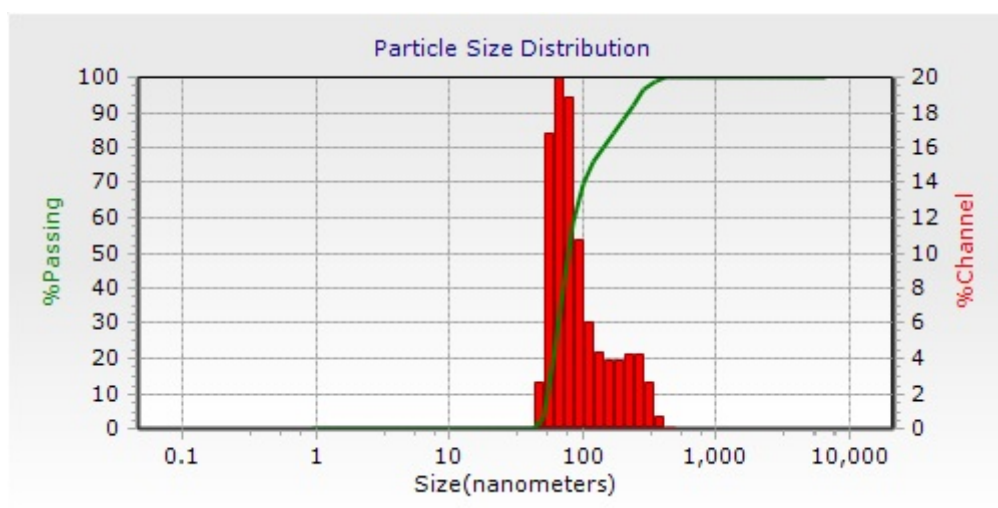


Рисунок 7 – Распределение частиц в препарате фуллеренола. Ось абсцисс - размер частиц, нм; ось ординат: слева – доля частиц с размером не менее данного, % (кривая); справа – доля частиц в интервале размеров, % (гистограмма)

3.2 Изучение совместного поступления свинца и наночастиц диоксида титана в эксперименте

3.2.1 Масса тела и внутренних органов

Как показало еженедельное взвешивание животных, на первой неделе эксперимента абсолютный и относительный приросты массы тела крыс 3-й группы, получавших ацетат свинца вместе с высокой дозой НЧ TiO_2 , были достоверно выше по сравнению с группами 1 и 2; в дальнейшем средние приросты массы различались недостоверно (Таблица 12). На протяжении эксперимента отмечена гибель двух крыс в группе 1 и двух крыс в группе 2. Вскрытие всех павших животных показало, что непосредственной причиной гибели животных была двусторонняя пневмония. Остальные животные по своему внешнему виду, состоянию шерстяного покрова и слизистых оболочек, двигательной активности, поведению не отличались от животных контрольной группы, имели нормальный стул.

Прирост массы тела крыс за 23 суток (в % от исходного уровня) представлен в Таблице 13; все различия между группами были недостоверны ($p > 0,05$). Таким образом, такие интегральные показатели, как прирост массы тела и относительная масса внутренних органов животных показала, что при данных условиях эксперимента существенных различий по этим показателям не наблюдалось.

Таблица 12 – Масса тела ($M \pm m$) крыс, получавших ацетат свинца и НЧ TiO_2 , и динамика её изменения (в абсолютном и относительном выражении) при внутрижелудочном введении на протяжении 23 суток

Группы №№	Число крыс	Дни эксперимента									
		1	8				15			22	
		Масса, г	Масса, г	Прирост за 7 суток		Масса, г	Прирост за 7 суток		Масса, г	Прирост за 7 суток	
				г	%		г	%		г	%
1	8	139,6±3,7	178,8±5,6	39,1±2,5*	28,0±1,3	221,7±7,8	44,0±2,1	24,8±1,0	243,7±6,2	29,0±2,5	13,4±1,0
2	9	139,7±3,2	176,1±4,6	36,4±2,5*	26,1±1,6	219,0±5,1	43,8±1,4	25,1±1,0	256,4±8,0	37,4±4,2	17,0±1,8
3	9	141,4±2,8	186,9±3,7	45,4±2,5*	32,2±1,8**	226,6±6,7	39,4±5,4	21,5±3,0	265,0±7,5	38,4±2,1	17,0±0,9
P, ANOVA		>0,05	>0,05	0,04	0,03	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Различие $p_{1-3, 2-3}$ достоверно по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$);

** Различие p_{2-3} достоверно по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Таблица 13 – Сравнение абсолютных и относительных (в %) приростов массы тела крыс групп 1-3, получавших ацетат свинца и НЧ TiO₂

Группы №№	Число крыс	Прирост массы абсолютный, г $M \pm m$	Прирост массы относительный, % $M \pm m$
1	6	109,2±12,9	81,1±3,7
2	7	117,6±16,8	85,1±4,0
3	9	123,6±21,3	87,6±5,5
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1 – гр.2	>0,05	>0,05
	гр.1 – гр.3	>0,05	>0,05
	гр.2 – гр.3	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Масса внутренних органов (печень, селезенка, почки, гонады, сердце, тимус, легкие, надпочечники, головной мозг), выраженная в процентах от массы тела, не различалась достоверно между группами и находилась в пределах нормальных значений для крыс данного возраста (Таблица 14).

3.2.2 Содержание гемоглобина в крови

Содержание гемоглобина в крови у животных (Таблица 15) 2-й и 3-ей групп имело тенденцию к снижению, и было достоверно ниже (на 17,1%) у животных 3-ей группы, по сравнению с животными, получавшими только свинец. Это свидетельствует об увеличении токсического действия свинца при его совместном введении с НЧ TiO₂, более выраженное у животных, получавших свинец и НЧ TiO₂ в дозе 100 мг/кг массы тела.

Таблица 14 - Относительные массы внутренних органов крыс, получавших ацетат свинца и НЧ TiO₂, на 24-е сутки эксперимента

Группы №№	Число крыс	Органы, относительная масса %, M±m								
		Печень	Почки	Селезёнка	Сердце	Семенники	Тимус	Лёгкие	Надпочечники	Мозг
1	6	3,29±0,10	1,04±0,03	0,38±0,02	0,39±0,01	1,17±0,03	0,25±0,01	0,57±0,02	0,07±0,01	0,71±0,02
2	7	3,13±0,10	1,00±0,03	0,35±0,01	0,37±0,01	1,16±0,04	0,24±0,02	0,57±0,02	0,06±0,01	0,68±0,01
3	9	3,02±0,10	1,00±0,02	0,34±0,01	0,36±0,01	1,18±0,06	0,22±0,02	0,72±0,09	0,06±0,00	0,65±0,03
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр. 2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P,	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 15 – Средняя концентрация гемоглобина цельной крови у крыс групп 1-3

Группы №№	Число крыс	Концентрация Hb, г/дм ³
1	6	156,0±5,1
2	6	142,5±4,8
3	9	129,3±4,4
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		0,003
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05
	гр.1-гр.3	0,007
	гр.2-гр.3	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	НЧ TiO ₂	0,004

* Непараметрический критерий Манна-Уитни.

3.2.3 Содержание свинца во внутренних органах

Несколько противоречивые результаты были получены при изучении содержания свинца в органах экспериментальных животных (Таблица 16). В печени имелась тенденция (хотя и не достоверная) в накоплении свинца при совместном введении свинца и НЧ TiO₂. При этом уровни содержания свинца в печени у животных 2-ой и 3-ей групп были сопоставимы. Большее накопление свинца в печени у животных, получавших свинец совместно с НЧ TiO₂ коррелирует со снижением концентрации Hb в крови и может свидетельствовать об увеличении поступления свинца в организм и, соответственно, увеличении токсичности свинца при его совместном поступлении с НЧ TiO₂. В тоже время у животных при совместном введении свинца и НЧ TiO₂ в других органах (почки, селезенка, семенники и головной мозг) имело место снижение содержания этого токсиканта, более выраженное у животных 3-ей группы, которым вводили свинец и НЧ TiO₂ в дозе 100 мг/кг массы тела. Наиболее выражено это проявлялось в уровнях накопления свинца в почках, семенниках и головном мозге.

Полученные данные трудно оценить однозначно. По-видимому, НЧ TiO₂ при довольно высоких дозах свинца, могут 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, по-видимому, имеет место печеночно-кишечная рециркуляция свинца и, возможно предположить, что определенное количество свинца элиминируется из печени, адсорбируется на НЧ TiO₂ в просвете кишечника и быстрее выводится из организма. Во всяком случае, этим можно объяснить снижение содержания свинца в органах (за исключением печени).

Таблица 16 – Содержание свинца во внутренних органах крыс групп 1-3 на 24-е сутки эксперимента

Группы №№	Число крыс	Содержание свинца, мг/кг массы ткани, M±m				
		Печень	Почки	Селезёнка	Семенники	Головной мозг
1	6	0,70±0,11	15,07±1,18	0,78±0,13	0,43±0,17	0,45±0,04
2	7	0,95±0,24	11,14±1,54	0,66±0,18	0,11±0,03	0,41±0,05
3	9	0,86±0,17	7,50±1,10	0,45±0,10	0,09±0,03	0,28±0,09
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		>0,05	0,004	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	0,004	>0,05	0,028	0,045
	гр.2-гр.3	>0,05	0,039	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P,	НЧ TiO ₂	>0,05	0,006	>0,05	0,013	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.3 Изучение совместного поступления свинца и наночастиц диоксида кремния (220 м²/г)

3.3.1 Масса тела и внутренних органов

Как следует из данных, представленных в Таблице 17, в конце первой недели эксперимента абсолютная и относительная прибавки массы тела крыс группы 3 были достоверно выше по сравнению с группами 1 и 2, однако по истечении 2 -ой недели эксперимента относительная прибавка массы тела была достоверно ниже у животных группы 3, а в конце 3-й недели – также и у животных группы 2 по сравнению с животными группы 1. Животные по своему внешнему виду, состоянию шерстяного покрова и слизистых оболочек, двигательной активности, поведению не отличались от животных контрольной группы, имели нормальный стул.

Прирост массы тела крыс за 21 сутки (в % от исходного уровня) представлен в Таблице 18; все различия между группами были недостоверны ($p > 0,05$). В тоже время следует отметить, что прирост массы тела за время эксперимента у животных 3-й группы был наибольший (хотя и не достоверно), в то время как у животных 1-й и 2-й групп был практически одинаковым.

Массы изученных внутренних органов (селезенка, почки, гонады, сердце, тимус, легкие, надпочечники, головной мозг), выраженные в процентах от массы тела, не различались достоверно между группами и находились в пределах нормальных значений для крыс данного возраста, за исключением печени, масса которой достоверно снижалась с увеличением дозы вводимых НЧ ($p_{1-3} < 0,05$) (Таблица 19).

3.3.2 Содержание гемоглобина в крови

Содержание гемоглобина в цельной крови у животных 2-й и 3-й групп было достоверно выше (на 7,5% и 19,5%, соответственно), чем у животных 1-й группы, получавших только свинец (Таблица 20; непараметрический критерий Манна-Уитни, $p_{1-2, 1-3, 2-3} < 0,05$). В принципе это может свидетельствовать о том, что при совместном введении свинца и НЧ SiO₂ имеет место снижение проявления токсичности данного контаминанта за счет

НЧ

SiO₂.

Таблица 17 – Масса тела ($M \pm m$) крыс, получавших ацетат свинца и НЧ SiO_2 (220 $\text{м}^2/\text{г}$), и динамика её изменения (в абсолютном и относительном выражении) при внутрижелудочном введении на протяжении 21 суток

Группы №№	Дни эксперимента									
	1	8			15			22		
	Масса, г	Масса, г	Прирост за 7 суток		Масса, г	Прирост за 7 суток		Масса, г	Прирост за 7 суток	
			г	%		г	%		г	%
1*	83,8±2,8	108,7±5,2	24,9±7,3	31,9±9,3	159,6±5,2	50,9±2,6	48,0±3,9	188,6±6,7	29,0±2,4	18,1±1,3
2*	86,0±4,7	116,3±7,8	32,9±7,5	40,8±9,7	168,0±8,3	51,8±2,9	46,0±3,9	190,8±10,1	22,8±2,8	13,5±1,5
3*	80,8±2,6	130,3±5,7	49,6±4,5	61,5±5,5	177,6±7,6	47,2±2,4	36,3±1,2	200,8±7,8	23,2±1,0	13,2±0,7
P, ANOVA	>0,05	>0,05	0,035	0,048	>0,05	>0,05	0,036	>0,05	>0,05	0,011

* Численность группы животных – 9 особей

Таблица 18 - Сравнение абсолютных и относительных (в %) приростов массы тела крыс групп 1-3, получавших ацетат свинца и НЧ SiO₂ (220 м²/г) за 21 сутки эксперимента

Группы №№	Число крыс	Прирост массы абсолютный, г M±m	Прирост массы относительный, % M±m
1	9	104,8±8,6	128,2±13,2
2	8	107,4±10,2	132,0±14,7
3	9	120,0±7,0	149,5±9,5
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	НЧ SiO ₂ (220 м ² /г)	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 19 – Относительные массы внутренних органов крыс, получавших ацетат свинца и НЧ SiO₂ (220 м²/г), на 22-е сутки эксперимента

Группы №№	Число крыс	Органы, относительная масса %, M±m								
		Печень	Почки	Селезёнка	Сердце	Семенники	Тимус	Лёгкие	Надпочечники	Головной мозг
1	9	4,17±0,08	1,15±0,03	0,35±0,02	0,40±0,01	1,25±0,04	0,30±0,02	0,69±0,02	0,04±0,00	0,92±0,03
2	8	3,94±0,08	1,14±0,05	0,32±0,02	0,40±0,01	1,24±0,07	0,29±0,02	0,71±0,02	0,04±0,00	0,94±0,05
3	9	3,76±0,07	1,07±0,02	0,35±0,01	0,39±0,01	1,21±0,03	0,27±0,02	0,68±0,02	0,04±0,00	0,92±0,03
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		0,003	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	0,003	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	НЧ SiO ₂ (220 м ² /г)	0,002	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 20 – Средняя концентрация гемоглобина цельной крови у крыс групп 1-3

Группы №№	Число крыс	Концентрация Hb, г/дм ³
1	8	129,0±2,6
2	8	139,5±2,4
3	9	160,2±8,0
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		0,001
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1 – гр.2	0,015
	гр.1 – гр.3	0,007
	гр.2 – гр.3	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	НЧ SiO ₂ (220 м ² /г)	0,009

* Непараметрический критерий Манна-Уитни.

3.3.3 Экскреция 5-аминолевулиновой кислоты в моче

Экскреция 5-АЛК с мочой у крыс 2-й и 3-й групп, получавших на фоне свинцовой интоксикации НЧ SiO₂, была ниже по сравнению с животными 1 группы– в группе 2 на 29,6%, в группе 3- на 33,4%, что может свидетельствовать о возможном некотором снижении токсического действия свинца на организм животных под действием вводимых НЧ (Таблица 21), что в полной мере коррелирует с увеличением концентрации гемоглобина в крови.

Таблица 21 – Средняя концентрация 5-АЛК в моче животных групп 1-3

Группы №№	Число крыс	Экскреция 5-АЛК, мкмоль/сутки
1	8	5,00±0,82
2	8	3,52±0,76
3	8	3,33±0,37
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1 – гр.2	>0,05
	гр.1 – гр.3	>0,05
	гр.2 – гр.3	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	НЧ SiO ₂ (220 м ² /г)	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.3.4 Содержание свинца во внутренних органах

Как видно из представленных в Таблице 22 данных, каких-либо существенных различий по содержанию Pb в органах не наблюдалось. Все различия между группами были недостоверны ($p > 0,05$). Имеется очень незначительная тенденция к увеличению содержания свинца в (статистически не достоверная), но в тоже время в других органах (почки, семенники, головной мозг) содержание свинца у животных, получавших свинец и НЧ SiO₂ (220 м²/г), практически не различались с животными 1-й группы. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что при совместном поступлении свинца и НЧ SiO₂ (220 м²/г) не происходит увеличение накопления свинца во внутренних органах, что сопровождалось даже определенным снижением токсического действия свинца (увеличение концентрации Hb в крови и снижение экскреции 5-АЛК с мочой). Можно предположить, что НЧ SiO₂ (220 м²/г) способны в определенной степени адсорбировать свинец в просвете кишки и тем самым снижать его всасывание и накопление в органах и тканях. 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 большей степени.

Таблица 22 – Содержание свинца во внутренних органах крыс групп 1-3 (на 22-ые сутки эксперимента)

№ группы	Число крыс	Содержание свинца, мг/кг ткани, M±m				
		Печень	Почки	Селезёнка	Семенники	Головной мозг
1	9	3,18±0,57	14,88±1,70	1,92±0,27	0,18±0,07	0,41±0,06
2	8	3,32±0,61	13,95±1,41	1,50±0,32	0,16±0,02	0,44±0,04
3	9	3,44±0,84	13,03±1,86	1,56±0,65	0,23±0,09	0,52±0,07
Однородность распределения, группы 1-3, ANOVA, P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ (ANOVA) по фактору:	HЧ SiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.4 Изучение совместного поступления свинца и наночастиц диоксида кремния (300 м²/г)

3.4.1 Масса тела и внутренних органов

Результаты определения абсолютной и относительной массы тела животных, представленные в Таблице 23, указывают, что у животных всех групп (за исключением животных 2 группы) имело место снижение прироста массы тела, по сравнению с животными контрольной группы, однако достоверное снижение прироста массы тела наблюдалось только у животных 6 группы, получавших НЧ SiO₂ в дозе 100 мг/кг массы тела в сочетании с ацетатом свинца. У животных 3-й группы, получавших НЧ SiO₂ в дозе 100 мг/кг массы тела, также наблюдалось снижение прироста массы тела, однако оно не было столь выраженным. Однофакторный дисперсионный анализ показал, что причиной снижения прибавки массы тела у животных 6-ой группы, является, по-видимому, введение свинца ($p_{1-6} < 0,05$), но не НЧ SiO₂.

Относительная масса почек и семенников достоверно увеличивались у животных 4-й группы, получавших свинец, и у животных, получавших свинец с НЧ SiO₂ в обеих дозах (группа 5 и 6; $p_{1-4;1-5;1-6} < 0,01$) по сравнению с животными контрольной группы. Однако относительная масса почек и семенников у животных 5-й и 6-й групп была практически такой же, как и у животных 4-й группы. Имелась также тенденция к увеличению относительной массы надпочечников и мозга, наиболее выраженная у животных, получавших свинец и НЧ SiO₂ в высокой дозе. В тоже время следует отметить, что однофакторный дисперсионный анализ указал, в большинстве случаев, на достоверное ($p < 0,01$) влияние на эти показатели свинца, хотя в отношении массы надпочечников была выявлено влияние НЧ SiO₂. Достоверных изменений в относительной массе остальных внутренних органов животных всех групп отмечено не было (Таблица 24).

3.4.2 Содержание гемоглобина в крови

Довольно интересные данные были получены при изучении содержания Hb в крови. Как видно из данных, представленных в Таблице 25, у животных 4-ой группы, получавших ацетат свинца, наблюдалось довольно выраженное и достоверное снижение уровня Hb ($p_{1-4} < 0,05$), что свидетельствует о проявлении токсического действия свинца. Введение НЧ SiO₂ животным 2-й и 3-й групп приводило к увеличению содержания Hb в крови животных, наиболее выраженному у животных, получавших высокие дозы НЧ SiO₂ ($p_{1-3} < 0,05$). Введение НЧ SiO₂ в сочетании со свинцом увеличивало концентрацию Hb в крови, по сравнению с животными, получавшими только свинец, при этом его уровень был близок к значениям, имевших место у животных контрольной группы. Однофакторный дисперсионный анализ указал на достоверное ($p < 0,05$) влияние на этот показатель как свинца, так и НЧ SiO₂. При этом введение свинца приводило к

снижению концентрации Hb в крови, а введение только НЧ SiO₂ наоборот увеличивало его концентрацию в крови. Совместное введение свинца и НЧ SiO₂ в определенной мере нивелировало эффект снижения концентрации Hb в крови, проявляющийся при введении только свинца. Аналогичный эффект в отношении концентрации Hb в крови имел место и при введении НЧ SiO₂ другой размерности (глава 4.3). Сравнивая результаты двух экспериментов с использованием НЧ SiO₂ различной дисперсности можно сделать заключение, что введение только НЧ SiO₂ уже само по себе приводит к увеличению концентрации Hb в крови, а совместное введение свинца и НЧ SiO₂ несколько нивелирует эффект снижения содержания Hb в крови под влиянием свинца. Этот эффект, по-видимому, связан как с размерностью НЧ SiO₂, на что указывает и проведенный однофакторный анализ в обоих экспериментах, так и возможно с дозой.

Таблица 23 – Сравнение абсолютных и относительных (в %) приростов массы тела крыс, получавших ацетат свинца и НЧ SiO₂ (300 м²/г) за 22 суток эксперимента

Группы №№	Число крыс	Прирост массы, абсолютный, г, M±m	Прирост массы, относительный, %, M±m
1	10	143,8±6,4	103,5±3,9
2	10	153,9±8,3	113,7±7,4
3	8	125,0±9,6	92,6±8,6
4	9	121,2±9,6	93,5±9,3
5	10	128,4±10,0	97,2±9,1
6	7	104,3±12,9	77,3±11,8
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		0,012	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	0,015	0,025
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.6	>0,05	>0,05
	гр.4-гр.5	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	0,006	>0,05
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 24 – Относительные массы внутренних органов крыс, получавших ацетат свинца и НЧ SiO₂ (300 м²/г), на 23-и сутки эксперимента

Группы №№	Число крыс	Органы, относительная масса %, M±m								
		Печень	Почки	Селезёнка	Сердце	Семенники	Тимус	Лёгкие	Надпочечники	Мозг
1	10	3,92±0,14	0,62±0,02	0,72±0,04	0,36±0,01	0,94±0,03	0,25±0,01	0,57±0,01	0,028±0,001	0,64±0,01
2	10	4,10±0,13	0,65±0,01	0,69±0,05	0,33±0,002	1,01±0,03	0,21±0,01	0,54±0,01	0,030±0,002	0,61±0,01
3	8	3,53±0,15	0,68±0,01	0,66±0,03	0,35±0,01	0,91±0,13	0,24±0,02	0,56±0,02	0,035±0,003	0,70±0,01
4	9	3,97±0,13	0,77±0,02	0,78±0,04	0,35±0,01	1,07±0,04	0,26±0,02	0,58±0,02	0,030±0,001	0,71±0,02
5	10	3,83±0,13	0,75±0,02	0,69±0,06	0,35±0,01	1,07±0,04	0,25±0,01	0,54±0,03	0,034±0,002	0,67±0,02
6	7	3,80±0,09	0,76±0,02	0,67±0,02	0,33±0,01	1,15±0,05	0,25±0,01	0,57±0,04	0,034±0,003	0,75±0,02
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		>0,05	5,84×10⁻⁹	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	5,74×10⁻⁶
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	0,017	0,034	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	0,026	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,006
	гр.1-гр.4	>0,05	0,0002	>0,05	>0,05	0,022	>0,05	>0,05	>0,05	0,014
	гр.1-гр.5	>0,05	0,002	>0,05	>0,05	0,023	>0,05	>0,05	0,019	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	0,001	>0,05	>0,05	0,011	>0,05	>0,05	>0,05	0,002
	гр.2-гр.5	>0,05	0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,034
	гр.3-гр.6	>0,05	0,008	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.4-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	>0,05	1,52×10⁻¹⁰	>0,05	>0,05	0,007	>0,05	>0,05	>0,05	0,001
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,019	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 25 – Концентрация гемоглобина в крови

Группы №№	Число крыс	Концентрация Нв, г/дм ³
1	10	124,1±2,9
2	10	128,9±3,0
3	8	141,2±4,8
4	9	115,7±2,1
5	9	125,0±2,7
6	7	126,1±5,2
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		0,00038
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05
	гр.1-гр.3	0,013
	гр.1-гр.4	0,041
	гр.1-гр.5	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05
	гр.3-гр.6	>0,05
	гр.4-гр.5	>0,05
	гр.4-гр.6	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	0,0081
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	0,0032

* Непараметрический критерий Манна-Уитни.

3.4.3 Экскреция 5-аминолевулиновой кислоты и порфибилиногена с мочой

Экскреция 5-АЛК с мочой у животных 4-6-й групп, получавших ацетат свинца, многократно и достоверно ($p_{1-4;1-5;1-6} < 0,001$) увеличивалась, по сравнению с животными 1-ой группы (Таблица 26; Рисунок 8).

Таблица 26 – Экскреция 5-АЛК (M±m) с мочой у крыс, получавших свинец в комбинации с НЧ SiO₂ (300 м²/г)

Группы №№	Число крыс	Экскреция 5-АЛК, ммоль/сутки
1	6	1,35±0,10
2	6	1,11±0,16
3	6	1,12±0,17
4	5	6,02±0,73
5	6	6,40±0,37

6	6	5,53±0,79
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		3,63 x 10⁻¹¹
Достоверность различий при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05
	гр.1-гр.4	0,006
	гр.1-гр.5	0,004
	гр.1-гр.6	0,004
	гр.2-гр.5	0,004
	гр.3-гр.6	0,004
	гр.4-гр.5	>0,05
гр.4-гр.6	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору	Ацетат свинца	9,76 x 10⁻¹⁵
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни.

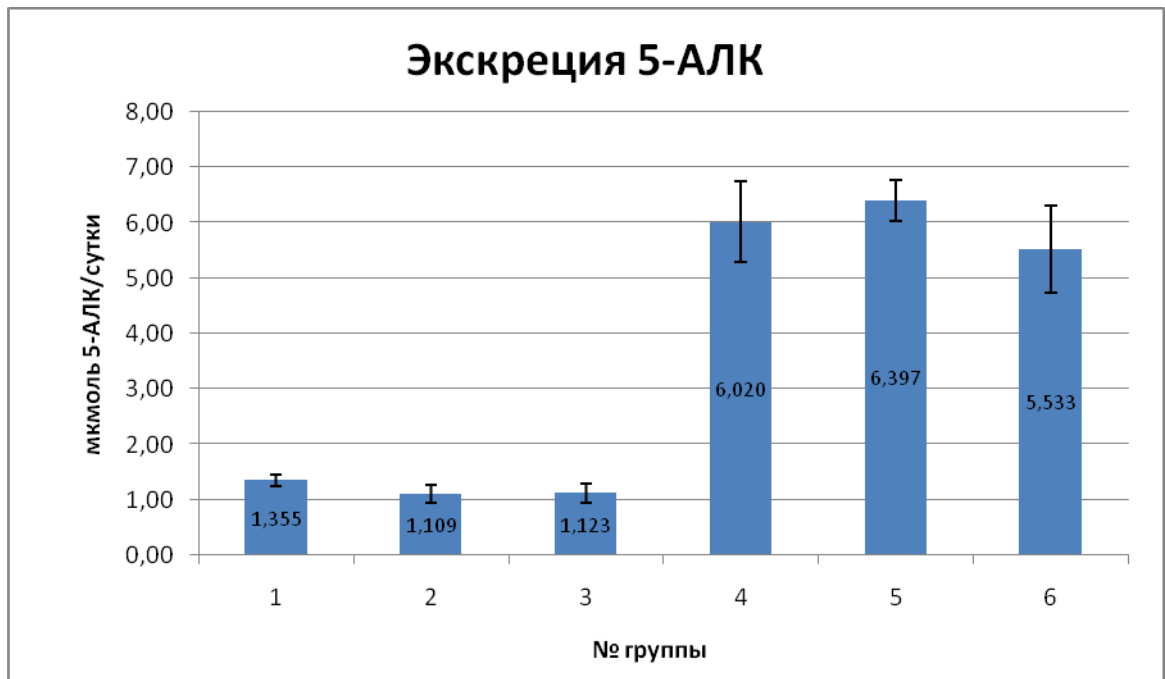


Рисунок 8 – Средние ($M \pm m$) концентрации 5-АЛК в моче крыс групп 1-6, получавших свинец в комбинации с НЧ SiO₂ (300 м²/г). По оси абсцисс - №№ групп; по оси ординат - концентрация, мкмоль/дм³ (а); достоверность различий с показателем животных 1-й группы согласно критерию Манна-Уитни ($p_{1-4;1-5;1-6} < 0,001$)

При этом какая-либо зависимость этого показателя от дозы НЧ SiO₂ в группах 4-6 отсутствовала ($p_{4;5;4-6} > 0,05$). Однофакторный дисперсионный анализ указал на отсутствие влияния на экскрецию 5-АЛК перорально вводимых НЧ SiO₂ (300 м²/г).

Таблица 27 – Суточная экскреция порфобилиногена с мочой

Группы №№	Число крыс	Экскреция ПБГ, мкмоль/сутки
1	6	0,029±0,01
2	6	0,0088±0,0019
3	6	0,038±0,0059
4	5	0,060±0,013
5	6	0,11±0,0082
6	6	0,056±0,021
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		3,63 x 10⁻¹¹
Достоверность различий при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05
	гр.1-гр.5	0,006
	гр.1-гр.6	>0,05
	гр.2-гр.5	0,014
	гр.3-гр.6	>0,05
	гр.4-гр.5	0,022
	гр.4-гр.6	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору	Ацетат свинца	0,0005
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни.

Динамика изменения экскреции порфобилиногена с мочой (Таблица 27) была практически аналогична динамике изменения экскреции 5-АЛК: наблюдалось увеличение экскреции порфобилиногена у животных, получавших свинец (но не такое значимое, как 5-АЛК), дальнейшее увеличение его экскреции у животных 5 группы и снижение экскреции порфобилиногена до уровня, наблюдаемого у животных 6 группы, которым вводили свинец и НЧ SiO₂.

3.4.4 Содержание свинца и ряда других элементов во внутренних органах

При введении свинца наблюдается его существенное накопление в печени, почках и головном мозге (Таблица 28). Одновременное введение свинца и НЧ SiO₂ не приводит к дальнейшему увеличению его накопления во всех изученных органах ($p_{4-5;4-6} > 0,05$). Факторный дисперсионный анализ показал, что величина бионакопления свинца связана с пероральным введением свинца, но не зависит от НЧ SiO₂ ($p < 0,05$).

Профили распределения других изученных элементов (Cd, As, Se, Zn, Cu, Al, Cr, Mn, Co) в печени крыс (Таблица 29) показывают, что их содержание в целом аналогично у животных, получавших и не получавших свинец, и не показывает зависимости от дозы введенного наноразмерного SiO₂. Введение НЧ SiO₂ не приводит, во всяком случае, к усилению накопления таких токсичных элементов, как Cd и As, и к снижению тканевых запасов 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 ткани печени оказывается даже достоверно выше (хотя и незначительно по абсолютной величине) у животных группы 3, получавшей наибольшую дозу НЧ SiO₂ по сравнению с контрольной группой ($p_{1-3} < 0,05$). Единственным предположительно неблагоприятным воздействием на микроэлементный профиль печени крыс является почти двукратное достоверное увеличение содержания Al у животных, получавших свинец и НЧ SiO₂ в наибольшей дозе (группа 4 – $0,468 \pm 0,065$ мг/кг; группа 6 – $0,859 \pm 0,085$ мг/кг; $p_{4-6} < 0,05$). В отсутствие экспозиции свинцом подобный эффект не наблюдался.

Таблица 28 – Содержание свинца во внутренних органах крыс

Группы №№	Число крыс*	Содержание свинца, мг/кг ткани, M±m		
		Печень	Почки	Мозг
1	5-7	0,11±0,060	0,049±0,011	0,053±0,008
2	5-7	0,029±0,005	0,043±0,005	0,039±0,005
3	5-7	0,028±0,009	0,041±0,005	0,031±0,005
4	5-7	3,67±0,47	12,40±1,71	0,71±0,11
5	5-7	3,14±0,36	10,53±1,24	0,65±0,032
6	5-7	2,91±0,27	12,64±0,84	0,70±0,088
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		>0,05	4,05×10⁻¹⁵	2,49×10⁻¹⁰
Достоверность различия при попарном сравнении групп**	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	0,047
	гр.1-гр.4	0,002	0,002	0,009
	гр.1-гр.5	0,002	0,002	0,009
	гр.1-гр.6	0,002	0,002	0,009

	гр.2-гр.5	0,002	0,002	0,009
	гр.3-гр.6	0,002	0,002	0,009
	гр.4-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.4-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P	Ацетат свинца	$1,27 \times 10^{-17}$	$8,88 \times 10^{-19}$	$2,82 \times 10^{-14}$
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05

* Число крыс: печень - по 7 в группе, почки - по 7 в группе, мозг - по 5 в группе.

** Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 29 – Содержание некоторых элементов в печени крыс, получавших свинец и НЧ SiO₂ (300 м²/г)

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани								
		Кадмий	Мышьяк	Селен	Цинк	Медь	Алюминий	Хром	Марганец	Кобальт
1	7	0,027±0,003	0,023±0,003	0,82±0,047	28,00±0,90	4,77±0,29	0,60±0,095	0,22±0,05	1,73±0,066	0,074±0,007
2	7	0,023±0,001	0,018±0,002	0,83±0,058	28,67±1,26	4,48±0,22	0,56±0,067	0,39±0,13	1,90±0,027	0,059±0,005
3	7	0,028±0,003	0,018±0,002	0,85±0,025	32,62±0,66	5,45±0,16	0,52±0,054	0,13±0,007	1,99±0,068	0,076±0,006
4	7	0,026±0,001	0,014±0,001	0,86±0,032	30,16±0,71	5,19±0,17	0,47±0,065	0,12±0,008	1,94±0,073	0,088±0,006
5	7	0,023±0,001	0,017±0,002	0,91±0,058	31,00±1,04	5,24±0,25	0,43±0,030	0,12±0,009	2,12±0,038	0,084±0,006
6	7	0,034±0,004	0,035±0,018	0,94±0,060	33,16±1,76	5,20±0,13	0,86±0,085	0,19±0,029	1,86±0,069	0,090±0,011
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,022	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	0,048	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,048	>0,05
	гр.1-гр.3	0,048	>0,05	>0,05	0,006	0,025	>0,05	>0,05	0,025	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	0,024	>0,05	>0,05	0,035	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	0,048	>0,05	>0,05	>0,05	0,003	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	0,025	0,025	0,046	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,048	>0,05	>0,05	0,003	0,009
	гр.3-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,010	0,048	>0,05	>0,05
	гр.4-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,048	>0,05	0,003
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	0,037	>0,05	>0,05	>0,05	0,036	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 30 – Содержание некоторых элементов в почках крыс, получавших свинец и НЧ SiO₂ (300 м²/г)

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани									
		Кадмий	Мышьяк	Селен	Железо	Цинк	Медь	Алюминий	Хром	Марганец	Кобальт
1	7	0,068±0,003	0,015±0,002	1,42±0,084	49,61±3,80	29,90±1,03	5,82±0,20	0,81±0,09	0,15±0,014	0,83±0,028	0,15±0,009
2	7	0,061±0,004	0,009±0,001	1,39±0,034	45,14±3,01	30,43±1,73	6,63±0,39	0,79±0,10	0,14±0,016	0,83±0,019	0,14±0,007
3	7	0,066±0,004	0,012±0,002	1,37±0,044	53,28±2,39	29,27±1,08	6,03±0,27	1,14±0,40	0,13±0,010	0,81±0,046	0,15±0,008
4	7	0,058±0,003	0,014±0,003	1,16±0,043	44,67±4,74	29,38±1,70	5,97±0,28	0,73±0,09	0,13±0,012	0,78±0,024	0,12±0,004
5	7	0,063±0,002	0,009±0,001	1,08±0,019	37,95±0,87	26,11±0,65	5,61±0,22	0,71±0,08	0,11±0,005	0,81±0,022	0,13±0,006
6	7	0,073±0,008	0,011±0,001	1,20±0,050	46,78±5,84	28,36±0,94	6,08±0,31	0,73±0,05	0,13±0,008	0,85±0,023	0,13±0,009
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		>0,05	>0,05	0,000042	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,007
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05	0,025	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,009
	гр.1-гр.5	>0,05	0,048	0,003	0,021	0,009	>0,05	>0,05	0,035	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	0,048	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	0,002	>0,05	0,009	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.6	>0,05	>0,05	0,048	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.4-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.4-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,048	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	>0,05	>0,05	3,82×10⁻⁷	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,00035
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	0,019	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 31 – Содержание некоторых элементов в головном мозге крыс, получавших свинец и НЧ SiO₂ (300 м²/г)

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани									
		Кадмий	Мышьяк	Селен	Железо	Цинк	Медь	Алюминий	Хром	Марганец	Кобальт
1	5	0,007±0,003	0,013±0,004	0,24±0,032	18,79±0,80	13,15±0,53	2,77±0,13	0,60±0,05	0,14±0,017	0,38±0,014	0,011±0,002
2	5	0,002±0,001	0,009±0,002	0,25±0,026	17,73±0,27	13,34±0,56	3,09±0,16	0,81±0,17	0,11±0,012	0,37±0,005	0,007±0,0002
3	5	0,002±0,001	0,005±0,002	0,19±0,017	18,68±0,37	13,02±0,31	2,76±0,13	0,67±0,08	0,18±0,083	0,34±0,005	0,007±0,001
4	5	0,001±0,0001	0,008±0,001	0,21±0,022	18,55±0,94	13,73±0,45	3,20±0,26	1,01±0,33	0,10±0,007	0,35±0,001	0,007±0,0003
5	5	0,001±0,0004	0,007±0,002	0,26±0,012	20,30±0,79	13,73±0,45	3,85±0,39	1,21±0,45	0,12±0,014	0,38±0,008	0,007±0,0002
6	5	0,001±0,0005	0,009±0,002	0,26±0,027	18,72±0,46	13,71±0,23	3,06±0,23	0,86±0,13	0,11±0,018	0,38±0,006	0,007±0,001
Однородность распределения, группы 1-6, ANOVA, P		0,031	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,037	>0,05	>0,05	0,046	0,012
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,047
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,016
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,028	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,047
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	0,009	0,047	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.6	>0,05	0,047	0,047	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,009	>0,05
	гр.4-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
гр.4-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору	Ацетат свинца	0,036	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,022	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,042

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Содержание эссенциальных микроэлементов Zn, Cu и Se в почках крыс достоверно снижается при малой дозе наноразмерного SiO₂ ($p_{2-5} < 0,05$) на фоне свинцовой интоксикации, а при высокой – появляется тенденция к повышению, однако только для Se ($p_{5-6} < 0,05$) данное изменение является достоверным (Таблица 30). Стоит отметить, что содержание в тканях почек животных таких элементов, как As, Fe, Zn, Cu, Al, Cr и Mn не изменяется при свинцовой интоксикации ($p_{1-4} > 0,05$) при сравнении с животными группы 1, получавшими деионизованную воду. Введение наноразмерного SiO₂ в обеих дозах на фоне свинцовой интоксикации ($p_{2-5,3-6} > 0,05$) не приводило к достоверному изменению содержания Cd, As, Fe, Al, Cr и Mn.

В таблице 31 показаны уровни накопления в головном мозге других изученных элементов, содержание которых в целом не менялось под действием соли свинца (исключение составляет достоверное снижение содержания Co, $p_{1-4} < 0,05$) по сравнению с животными 1-ой контрольной группы. Введение низкой дозы НЧ SiO₂ на фоне свинцовой интоксикации приводило к достоверному повышению накопления Zn и Fe ($p_{2-5} < 0,05$), в то время как при высокой дозе отмечалось увеличение содержания As, Mn и Se.

3.5 Изучение совместного поступления свинца и наночастиц оксида алюминия

3.5.1 Масса тела и внутренних органов

На протяжении всего эксперимента по совместному введению животным соли свинца и НЧ Al₂O₃ не было выявлено каких-либо изменений как в абсолютном, так и в относительном приросте массы тела (Таблица 32). Гибель животных не наблюдалась. Все крысы по своему внешнему виду, состоянию шерстяного покрова и слизистых оболочек, двигательной активности, поведению не отличались от животных контрольной группы, имели нормальный стул.

Прирост массы тела крыс за 22 суток (в % от исходного уровня) представлен в Таблице 33, все различия между группами недостоверны ($p > 0,05$). Однако следует отметить, что имелась определенная тенденция в снижении прироста массы тела у животных 4 группы, которым вводили свинец и НЧ Al₂O₃ в высокой дозе (100 мг/кг массы тела).

Если относительная масса печени у животных всех экспериментальных групп была практически одинаковой, хотя и имелась не выраженная тенденция увеличения относительной массы печени у животных 4 группы по сравнению с контрольной группой животных (Таблица 34), то относительная масса почек достоверно увеличивалась по сравнению с контролем у животных 2-й группы, получавших свинец, и у животных, получавших свинец и НЧ Al₂O₃ в обеих дозах (группа 3 и 4; $p_{1-2,1-3,1-4} < 0,05$). При этом имелась выраженная тенденция к увеличению относительной массы почек при увеличении дозы вводимых НЧ, что

подтверждается однофакторным дисперсионным анализом ($p < 0,05$, ANOVA по фактору наличия НЧ). Относительная масса селезенки достоверно увеличивалась у животных 2-й и 4-й групп ($p_{1-2,1-4} < 0,05$) по сравнению с 1-й группой животных и незначительно увеличивалась у крыс 3-й группы. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) указал на влияние на этот показатель со стороны вводимого свинца ($p < 0,05$), но не НЧ Al_2O_3 ($p > 0,05$). Достоверных изменений в относительной массе остальных внутренних органов животных всех групп отмечено не было (Таблица 34), хотя все-таки имелась незначительная тенденция увеличения относительной массы семенников, легких и головного мозга у животных 4 группы, по сравнению с животными контрольной группы.

Таблица 33 – Сравнение абсолютных и относительных (в %) приростов массы тела крыс групп 1-4, получавших ацетат свинца и НЧ Al_2O_3 за 22 суток эксперимента

Группы №№	Число крыс	Прирост массы, абсолютный, г $M \pm m$	Прирост, относительный, % $M \pm m$
1	10	133,1 \pm 7,7	202,5 \pm 5,2
2	9	116,3 \pm 8,9	193,0 \pm 8,1
3	9	124,0 \pm 6,6	196,3 \pm 5,1
4	8	108,4 \pm 12,8	186,7 \pm 9,9
Однородность распределения, группы 1-4, ANOVA, P		>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	>0,05	>0,05
	НЧ Al_2O_3	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 34 – Относительные массы внутренних органов крыс, получавших ацетат свинца и НЧ Al₂O₃, на 23-и сутки эксперимента

Группы №№	Число крыс	Органы, относительная масса %, M±m								
		Печень	Почки	Селезёнка	Сердце	Семенники	Тимус	Лёгкие	Надпочечники	Мозг
1	10	3,56±0,05	0,74±0,02	0,58±0,05	0,36±0,01	1,11±0,02	0,24±0,01	0,62±0,01	0,03±0,00	0,68±0,03
2	9	3,74±0,11	0,85±0,01	0,75±0,05	0,38±0,01	1,11±0,04	0,21±0,01	0,64±0,01	0,03±0,00	0,72±0,02
3	9	3,54±0,09	0,88±0,03	0,73±0,04	0,36±0,01	1,11±0,03	0,23±0,01	0,67±0,02	0,03±0,00	0,71±0,02
4	8	3,83±0,20	0,94±0,06	0,78±0,05	0,39±0,02	1,16±0,14	0,21±0,02	0,78±0,11	0,03±0,00	0,76±0,04
Однородность распределения, группы 1-4, ANOVA, P		>0,05	0,005	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05	0,005	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	0,007	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	0,002	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	>0,05	0,001	0,007	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ Al ₂ O ₃	>0,05	0,005	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.5.2 Содержание гемоглобина в крови

Результаты определения Hb в цельной крови, представленные в Таблице 35, показали, что его содержание достоверно снижалось 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 отсутствовала ($p_{2-3, 2-4} > 0,05$). Следует отметить, что введение свинца приводило к достаточно существенному снижению концентрации Hb в крови у животных группы 2, в тоже время совместное введение свинца и НЧ Al_2O_3 в обеих дозах практически не влияло на содержание Hb в крови у животных 3-й и 4-й групп. В тоже время проведенный однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) указал на влияние на этот показатель со стороны как вводимого свинца ($p < 0,05$), так и НЧ Al_2O_3 ($p < 0,05$).

Таблица 35 – Содержание гемоглобина в крови

Группы №№	Число крыс	Содержание Hb, г/дм ³
1	9	144,6±1,5
2	8	134,0±2,9
3	7	133,6±1,8
4	8	129,9±2,9
Однородность распределения, группы 1-4, ANOVA, P		0,001
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	0,006
	гр.1-гр.3	0,001
	гр.1-гр.4	0,002
	гр.2-гр.3	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	0,007
	НЧ Al_2O_3	0,007

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.5.3 Экскреция 5-аминолевулиновой кислоты и порфибилиногена с мочой

Экскреция 5-АЛК с мочой у крыс опытных групп, которым вводили свинец, а также свинец и НЧ Al_2O_3 , многократно увеличивалась по сравнению с животными контрольной группы. При этом зависимости этого показателя от дозы вводимых НЧ Al_2O_3 не наблюдалось ($p_{2-3, 2-4, 3-4} > 0,05$) (Таблица 36), а однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) указал на влияние на этот показатель со стороны как вводимого свинца ($p < 0,05$), так и НЧ Al_2O_3 ($p < 0,05$).

Таблица 36 – Экскреция 5-АЛК ($M \pm m$) с мочой у крыс

Группы №№	Число крыс	Экскреция 5-АЛК, ммоль/сутки
1	6	0,80±0,08
2	6	4,54±0,56
3	6	7,34±1,35
4	6	5,71±0,74
Однородность распределения, группы 1-4, ANOVA, P		0,00014
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	0,004
	гр.1-гр.3	0,004
	гр.1-гр.4	0,004
	гр.2-гр.3	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	0,00006
	НЧ Al ₂ O ₃	0,001

* Непараметрический критерий Манна-Уитни.

Таблица 37 – Экскреция порфобилиногена с мочой

Группы №№	Число крыс	Экскреция ПБГ, мкмоль/сутки
1	6	0,031±0,002
2	6	0,065±0,01
3	6	0,079±0,01
4	6	0,073±0,01
Однородность распределения, группы 1-4, ANOVA, P		0,002
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	0,01
	гр.1-гр.3	0,004
	гр.1-гр.4	0,004
	гр.2-гр.3	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	0,0002
	НЧ Al ₂ O ₃	0,005

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Изменение экскреции порфобилиногена с мочой (Таблица 37) была практически аналогична изменениям экскреции 5-АЛК: увеличение экскреции порфобилиногена у животных, получавших свинец (но не такое значимое, как 5-АЛК), дальнейшее увеличение его экскреции у животных 3 группы, которое остается практически таким же и у животных 4 группы.

3.5.4 Содержание свинца во внутренних органах

При введении свинца крысам 2-й группы наблюдалось многократное и достоверное увеличение его накопления в печени, почках, селезенке и головном мозге по сравнению с животными 1-й контрольной группы ($p_{1-2} < 0,05$) (Таблица 38). Увеличение содержания свинца в семенниках было значительно менее заметным. В 3-й и 4-й группах животных по мере увеличения дозы совместно вводимых со свинцом НЧ Al_2O_3 , имело место дальнейшее возрастание содержания свинца в печени крыс ($p_{1-3, 1-4, 2-3, 2-4} < 0,05$). Похожий эффект для селезенки, подтверждаемый однофакторным дисперсионным анализом по фактору НЧ ($p < 0,05$, ANOVA), являлся менее выраженным. Для остальных органов (селезенка, семенники, головной мозг) сочетанное введение НЧ Al_2O_3 существенного влияния на бионакопление свинца не оказывало. Таким образом совместное введение свинца и НЧ Al_2O_3 не приводило к увеличению содержания свинца в органах (за исключением печени) по сравнению с животными, получавшими только свинец. На основании полученных данных можно заключить, что НЧ Al_2O_3 , по-видимому, не оказывают прямого существенного влияния на процессы всасывания и накопления свинца, а отмеченные некоторые отрицательные тенденции связаны с возможным проявлением воздействия алюминия, вводимого в виде НЧ Al_2O_3 . В соответствии с имеющимися литературными данными [68] наименьшая доза алюминия (но не НЧ Al_2O_3), вызывающая наблюдаемые негативные явления в организме крыс (LOEL) составляет 75-80 мг/кг массы тела в сутки, а в наших исследованиях она была 100 мг/кг массы тела в сутки.

Таблица 38 – Содержание свинца во внутренних органах крыс, получавших свинец в комбинации с НЧ Al₂O₃

Группы №№	Число крыс	Содержание свинца, мг/кг ткани, M±m				
		Печень	Почки	Селезёнка	Семенники	Головной мозг
1	5	0,03±0,01	0,10±0,05	0,12±0,02	0,09±0,01	0,12±0,02
2	8	1,17±0,19	13,00±2,05	0,72±0,12	0,13±0,02	0,59±0,06
3	8	1,96±0,25	12,61±2,12	1,15±0,22	0,13±0,02	0,57±0,06
4	8	2,16±0,23	10,80±1,47	0,74±0,14	0,13±0,02	0,55±0,06
Однородность распределения, группы 1-4, ANOVA, P		0,000004	0,002	0,00034	>0,05	0,001
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	0,003	0,007	0,001	>0,05	0,001
	гр.1-гр.3	0,003	0,007	0,001	>0,05	0,001
	гр.1-гр.4	0,003	0,007	0,001	>0,05	0,001
	гр.2-гр.3	0,046	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	0,006	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	Ацетат свинца	0,00002	0,001	0,0002	0,040	0,00000001
	НЧ Al ₂ O ₃	0,00001	0,231	0,004	>0,05	0,015
Факторный анализ, ANOVA, P, гр.2-гр.4, по фактору:	НЧ Al ₂ O ₃	0,003	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.6 Изучение совместного поступления кадмия и наноматериалов (наночастицы диоксида титана, диоксида кремния (300 м²/г) и фуллеренол)

3.6.1 Масса тела и внутренних органов

Из данных, представленных в Таблице 39 следует, что каких-либо значимых изменений как в абсолютном, так и в относительном приросте массы тела на протяжении всего эксперимента в группах животных, получавших как кадмий, так и различные наноматериалы совместно с кадмием, не наблюдалось.

Прирост массы тела крыс (в % от исходного уровня) представлен в Таблице 40, все различия между группами недостоверны ($p > 0,05$).

В тоже время следует отметить некоторое снижение относительной массы печени у животных, получавших НЧ SiO₂ (300 м²/г) в дозе 100 мг/кг массы тела (группа 4) и фуллеренол в дозе 1 мг/кг массы тела, по сравнению с как с контрольной группой (группа 1), так и с группой животных, которым вводили кадмий (группа 2). Наблюдалось также некоторое увеличение относительной массы семенников у животных, получавших НЧ SiO₂ в дозе 1 мг/кг массы тела (группа 3) и животных, получавших фуллеренол (группы 7 и 8), по сравнению в животными групп 1 и 2. Снижение относительной массы легких и тимуса наблюдались при введении фуллеренола в дозе 1 мг/кг (группа 7) по сравнению с животными группы 2, в то время как введение фуллеренола в дозе 10 мг/кг (группа 8) вызывало увеличение относительной массы легких, по сравнению с животными группы 2 и группы 1 ($p_{7-8} < 0,05$ по критерию Манна-Уитни для легких). Достоверных дозозависимых изменений в относительной массе остальных внутренних органов животных всех групп отмечено не было (Таблица 41).

Таблица 40 – Сравнение абсолютных и относительных (в %) приростов массы тела крыс групп 1-8.

Группы №№	Число крыс	Прирост массы, абсолютный, г, $M \pm m$	Прирост массы, относительный, % $M \pm m$
1	12	145,8±4,0	170,5±7,3
2	13	152,5±5,9	177,2±10,6
3	13	146,3±6,0	178,8±9,3
4	10	140,9±8,8	158,4±10,4
5	12	142,0±10,3	180,2±16,7
6	16	140,3±5,5	160,9±5,5
7	12	149,3±3,3	174,0±5,4
8	16	140,6±6,2	167,1±8,4
Однородность распределения, группы 1-8, ANOVA, P		>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.8	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05
гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	$CdCl_2$	>0,05	>0,05
	НЧ SiO_2 (300 м ² /г)	>0,05	>0,05
	НЧ TiO_2	>0,05	>0,05
	$C_{60}(OH)_{24}$	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 41 - Относительные массы внутренних органов крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Органы, относительная масса %, М±m								
		Печень	Почки	Селезёнка	Сердце	Семенники	Тимус	Лёгкие	Надпочечники	Мозг
1	9	3,35±0,096	0,69±0,014	0,62±0,043	0,37±0,008	1,10±0,042	0,29±0,018	0,59±0,050	0,037±0,002	0,77±0,023
2	7	3,63±0,26	0,66±0,023	0,64±0,038	0,36±0,011	1,15±0,070	0,26±0,024	0,55±0,018	0,033±0,002	0,78±0,022
3	7	3,68±0,21	0,65±0,014	0,64±0,070	0,36±0,009	1,26±0,045	0,26±0,011	0,55±0,011	0,033±0,002	0,81±0,032
4	6	3,10±0,07	0,69±0,022	0,57±0,018	0,40±0,023	1,13±0,070	0,26±0,020	0,64±0,077	0,033±0,002	0,78±0,035
5	6	3,49±0,15	0,69±0,025	0,67±0,043	0,37±0,011	1,11±0,075	0,29±0,022	0,56±0,027	0,037±0,002	0,80±0,045
6	10	3,48±0,14	0,67±0,009	0,69±0,050	0,38±0,010	1,14±0,089	0,26±0,010	0,61±0,035	0,032±0,002	0,81±0,032
7	6	3,11±0,15	0,66±0,026	0,60±0,038	0,42±0,068	1,20±0,068	0,23±0,012	0,54±0,025	0,035±0,002	0,76±0,023
8	10	3,31±0,11	0,71±0,012	0,63±0,037	0,38±0,016	1,25±0,030	0,29±0,012	0,65±0,047	0,035±0,002	0,83±0,029
Группы 1-8, ANOVA, P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	0,038	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,017	>0,05	0,041	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,040	>0,05
	гр.3-гр.4	0,032	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,008	0,033	>0,05	
ANOVA, P, по фактору	CdCl ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

3.6.2 Влияние наноматериалов на содержание кадмия и других элементов во внутренних органах

При введении Cd наблюдается его значительное накопление в печени, почках и в меньшей степени выраженности в головном мозге ($p_{1-2} < 0,05$ по критерию Манна-Уитни; Таблица 42). Введение НЧ SiO₂ (300 м²/г) и НЧ TiO₂ приводит к увеличению накопления Cd в печени при увеличении дозы вводимых НЧ, в то время как увеличение дозы фуллеренола приводит, наоборот, к некоторому снижению накопления Cd в печени. На содержание Cd в почках и головном мозге ни НЧ SiO₂ (300 м²/г), ни НЧ TiO₂, ни фуллеренол практически не оказывали никакого влияния.

Таблица 42 – Содержание кадмия во внутренних органах крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Содержание кадмия, мкг/г ткани, $M \pm m$		
		Печень	Почки	Головной мозг
1	8	0,08±0,01	0,10±0,006	0,009±0,002
2	8	3,83±0,14	3,53±0,18	0,014±0,001
3	8	5,21±0,49	3,83±0,27	0,017±0,002
4	8	5,40±0,51	3,44±0,26	0,014±0,001
5	8	4,21±0,42	3,64±0,16	0,013±0,001
6	8	4,24±0,50	3,68±0,16	0,012±0,001
7	8	4,74±0,25	3,45±0,30	0,012±0,001
8	8	4,49±0,35	3,72±0,20	0,013±0,001
Однородность распределения, группы 1-8, ANOVA, P		5,07×10⁻¹³	2,04×10⁻¹⁸	0,017
Достоверность различия при попарном сравнении групп*	гр.1-гр.2	0,001	0,001	0,020
	гр.1-гр.3	0,001	0,001	0,011
	гр.1-гр.4	0,001	0,001	0,037
	гр.1-гр.5	0,001	0,001	0,048
	гр.1-гр.6	0,001	0,001	0,011
	гр.1-гр.7	0,001	0,001	0,020
	гр.1-гр.8	0,001	0,001	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	0,020	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	0,011	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P	CdCl ₂	1,62×10⁻¹⁵	7,96×10⁻²⁴	0,001
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	0,004	>0,05	>0,05
	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Результаты анализа микроэлементного состава тканей исследованных органов в зависимости от введения животным кадмия и наноматериалов, представлены в табл. 43-48.

Следует отметить некоторые изменения в уровне содержания и распределении элементов в органах при введении Cd (изучаемые микроэлементы поступали только с кормом в фоновых

количествах). Это характеризовалось тенденцией в снижении содержания в печени Pb, Ag, Al, Cu и Co, что можно объяснить межэлементным взаимодействием в процессе всасывания этих веществ. Однако, это практически никак не влияло на содержание практически всех микроэлементов в почках (за исключением достоверного увеличения содержания Cu и Co), а также в головном мозге (за исключением выраженной тенденции в снижении содержания Ni, хотя и не достоверного). В связи с этим, изменения в содержании микроэлементов в органах при совместном введении Cd и наноматериалов (НЧ SiO₂, НЧ TiO₂ и фуллеренола) необходимо, в первую очередь, сравнивать не с животными группы 1, а с животными группы 2, которым вводили только Cd.

При введении Cd в сочетании с НЧ SiO₂ имеется тенденция увеличения накопления в печени Pb, As, Ag, Zn и Cu в зависимости от дозы вводимых наночастиц, однако только для As и Zn эти изменения являются достоверными ($p_{2-4} < 0,05$). В тоже время результаты проведенных исследований показывают, что введение НЧ SiO₂ совместно с Cd не влияет на накопление всех исследованных элементов в почках и головном мозге.

В отношении совместного введения Cd и НЧ TiO₂. Здесь наблюдалась несколько иная картина: некоторое снижение содержания в печени Pb, Ni, Cu, Mn и Co, при существенном (хотя и недостоверном) увеличении содержания Ag и Al. В тоже время имела место тенденция к снижению содержания Pb, Ag и Cu в почках, а в головном мозге различий не наблюдалось.

При совместном введении фуллеренола и Cd наблюдалась тенденция к увеличению содержания в печени Ag, Ni и Al. В почках и головном мозге изменений содержания микроэлементом выявлено не было.

Таким образом, полученные данные показывают, что имеет место некоторые изменения в накоплении тех или иных микроэлементов в печени, в то время как в почках и головном мозге практически никаких изменений не наблюдалось, что может указывать на отсутствие влияния изученных наноматериалов на процессы депонирования ряда токсичных и эссенциальных микроэлементов в органах и тканях при их обычном (фоновом) содержании в кормах.

Таблица 43 – Содержание (M±m) некоторых элементов в печени крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани				
		Свинец	Мышьяк	Серебро	Никель	Алюминий
1	8	0,064±0,008	0,020±0,002	4,14±1,40	0,87±0,11	1,24±0,34
2	8	0,046±0,009	0,018±0,001	2,31±0,75	0,79±0,11	0,76±0,055
3	8	0,038±0,007	0,018±0,002	1,94±0,75	0,94±0,067	0,67±0,059
4	7	0,051±0,009	0,025±0,002	2,27±1,44	0,76±0,061	0,71±0,026
5	8	0,042±0,007	0,020±0,001	1,47±0,72	1,05±0,19	0,84±0,11
6	8	0,031±0,008	0,020±0,002	5,26±1,59	0,81±0,039	1,004±0,17
7	7	0,030±0,006	0,023±0,002	1,001±0,40	0,83±0,057	0,70±0,014
8	8	0,045±0,009	0,020±0,002	3,19±0,83	0,97±0,11	0,97±0,10
Группы 1-8, ANOVA, P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	0,035	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05	0,037	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	0,011	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	0,020	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	0,047	>0,05	0,037	>0,05
гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	0,035	>0,05	>0,05	
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	0,037	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	CdCl ₂	0,006	>0,05	>0,05	>0,05	0,009
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,043
	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 44 – Содержание ($M \pm m$) некоторых элементов в печени крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани				
		Цинк	Медь	Хром	Марганец	Кобальт
1	8	34,74±1,88	5,49±0,32	0,19±0,016	2,17±0,11	0,073±0,004
2	8	37,27±2,22	5,094±0,43	0,19±0,021	2,21±0,13	0,064±0,005
3	8	39,28±1,43	5,20±0,27	0,19±0,021	2,35±0,12	0,071±0,003
4	7	48,11±2,37	6,60±0,63	0,18±0,004	2,52±0,073	0,073±0,005
5	8	43,25±2,32	6,52±0,79	0,16±0,010	2,32±0,12	0,083±0,005
6	8	38,75±1,57	5,007±0,28	0,17±0,011	2,13±0,080	0,067±0,002
7	7	44,20±2,30	6,32±0,16	0,16±0,007	2,61±0,10	0,073±0,006
8	8	42,69±1,79	5,62±0,22	0,16±0,010	2,47±0,088	0,077±0,010
Группы 1-8, ANOVA, P		0,0005	0,049	>0,05	0,019	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	0,001	>0,05	>0,05	0,020	>0,05
	гр.1-гр.5	0,015	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	0,027	>0,05	>0,05	0,020	>0,05
	гр.1-гр.8	0,015	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	0,037	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	0,037	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	0,035	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	0,020	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,035
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	CdCl ₂	0,004	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	0,033	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	>0,05	>0,05	0,013	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 45 – Содержание (M±m) некоторых элементов в почках крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани				
		Свинец	Мышьяк	Серебро	Никель	Алюминий
1	8	0,066±0,004	0,014±0,001	0,23±0,082	0,040±0,003	0,43±0,066
2	8	0,060±0,002	0,013±0,001	0,30±0,11	0,040±0,001	0,36±0,017
3	8	0,060±0,003	0,013±0,001	0,26±0,12	0,046±0,002	0,37±0,026
4	8	0,052±0,002	0,014±0,001	0,23±0,084	0,039±0,002	0,34±0,026
5	8	0,065±0,004	0,014±0,001	0,14±0,036	0,045±0,003	0,34±0,025
6	8	0,050±0,002	0,013±0,001	0,067±0,028	0,040±0,001	0,36±0,018
7	8	0,061±0,003	0,016±0,001	0,075±0,022	0,041±0,002	0,36±0,025
8	8	0,064±0,001	0,017±0,001	0,10±0,032	0,039±0,002	0,34±0,010
Группы 1-8, ANOVA, P		0,001	0,037	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	0,045	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	0,015	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.8	>0,05	0,045	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	0,035	>0,05
	гр.2-гр.4	0,015	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	0,011	>0,05	0,035	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	0,030	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	0,045	0,015	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.5-гр.6	0,003	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	CdCl ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,025
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	0,00048	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 46 – Содержание (M±m) некоторых элементов в почках крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани				
		Цинк	Медь	Хром	Марганец	Кобальт
1	8	21,7±0,5	4,61±0,06	0,11±0,006	0,92±0,023	0,13±0,003
2	8	23,9±0,3	5,29±0,13	0,11±0,004	0,98±0,032	0,16±0,006
3	8	23,5±0,7	5,24±0,16	0,11±0,006	0,87±0,028	0,16±0,007
4	8	23,6±0,7	4,86±0,25	0,11±0,006	0,95±0,033	0,17±0,004
5	8	24,4±0,5	5,31±0,09	0,12±0,008	1,03±0,021	0,17±0,007
6	8	25,3±0,6	4,87±0,20	0,11±0,004	1,03±0,047	0,16±0,016
7	8	23,4±0,6	4,93±0,19	0,11±0,002	0,95±0,021	0,16±0,005
8	8	23,9±0,4	5,18±0,07	0,11±0,003	0,96±0,012	0,16±0,008
Группы 1-8, ANOVA, P		0,007	0,019	>0,05	0,005	0,008
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	0,003	0,001	>0,05	>0,05	0,001
	гр.1-гр.3	>0,05	0,006	>0,05	>0,05	0,020
	гр.1-гр.4	0,035	>0,05	>0,05	>0,05	0,001
	гр.1-гр.5	0,003	0,001	>0,05	0,011	0,001
	гр.1-гр.6	0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,001
	гр.1-гр.8	0,011	0,001	>0,05	>0,05	0,035
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	0,035	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	CdCl ₂	0,001	0,007	>0,05	>0,05	0,00007
	HЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	0,005	>0,05
	HЧ TiO ₂	0,015	>0,05	>0,05	0,001	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 47 – Содержание (M±m) некоторых элементов в головном мозге крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани				
		Свинец	Мышьяк	Серебро	Никель	Алюминий
1	7	0,039±0,006	0,010±0,001	0,02±0,004	0,081±0,028	0,45±0,065
2	8	0,030±0,003	0,010±0,001	0,017±0,005	0,045±0,010	0,36±0,061
3	8	0,031±0,003	0,009±0,001	0,011±0,003	0,041±0,007	0,40±0,062
4	8	0,031±0,003	0,009±0,001	0,017±0,008	0,041±0,008	0,39±0,064
5	8	0,027±0,003	0,008±0,001	0,009±0,002	0,035±0,005	0,36±0,064
6	8	0,029±0,003	0,008±0,001	0,009±0,002	0,048±0,007	0,38±0,065
7	8	0,030±0,003	0,009±0,0004	0,010±0,002	0,038±0,006	0,44±0,082
8	8	0,030±0,003	0,009±0,001	0,044±0,020	0,042±0,008	0,41±0,075
Группы 1-8, ANOVA, P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Достоверность различия при попарном сравнении групп *	гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.1-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.2-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	0,045	>0,05	
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:	CdCl ₂	0,013	>0,05	>0,05	0,002	>0,05
	НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	C ₆₀ (OH) ₂₄	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

Таблица 48 – Содержание ($M \pm m$) некоторых элементов в головном мозге крыс групп 1-8

Группы №№	Число крыс	Элемент, мкг/г ткани					
		Цинк	Медь	Хром	Марганец	Кобальт	
1	7	13,86±1,35	2,00±0,039	0,099±0,012	0,35±0,004	0,012±0,002	
2	8	13,22±0,85	2,02±0,029	0,085±0,010	0,37±0,010	0,009±0,001	
3	8	13,40±0,68	2,18±0,074	0,087±0,011	0,39±0,011	0,008±0,0004	
4	8	13,70±0,91	2,34±0,090	0,079±0,006	0,39±0,015	0,008±0,001	
5	8	12,15±0,39	2,04±0,063	0,071±0,005	0,38±0,010	0,008±0,0002	
6	8	11,76±0,20	2,10±0,078	0,080±0,010	0,36±0,012	0,009±0,001	
7	8	11,37±0,20	2,058±0,052	0,084±0,007	0,35±0,007	0,007±0,0001	
8	8	10,95±0,15	1,99±0,064	0,086±0,013	0,35±0,010	0,007±0,0004	
Группы 1-8, ANOVA, P		0,018	0,005	>0,05	0,009	0,001	
Достоверность различия при попарном сравнении групп *		гр.1-гр.2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.1-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	0,037	0,037
		гр.1-гр.4	>0,05	0,011	>0,05	0,037	0,037
		гр.1-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	0,037	>0,05
		гр.1-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.1-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,035
		гр.1-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,020
		гр.2-гр.3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.2-гр.4	>0,05	0,011	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.2-гр.5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.2-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.2-гр.7	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.2-гр.8	0,020	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.3-гр.4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		гр.5-гр.6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
гр.7-гр.8	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05		
Факторный анализ, ANOVA, P, по фактору:		CdCl ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	9,0×10⁻⁶
		НЧ SiO ₂ (300 м ² /г)	0,001	2,34×10⁻⁴	>0,05	0,005	>0,05
		НЧ TiO ₂	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
		C ₆₀ (OH) ₂₄	0,001	>0,05	>0,05	0,003	0,039

* Непараметрический критерий Манна-Уитни

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

В данной работе в ходе проведения токсикологических экспериментов на лабораторных животных по изучению влияния Pb и Cd при сочетанном использовании с некоторыми видами НМ были получены данные, требующие дополнительных подтверждений. В частности это относится к бионакоплению различных элементов в органах лабораторных животных.

Одним из возможных объяснений различий в уровнях накопления Pb²⁺ и Cd²⁺ при сочетанном поступлении с НЧ могут быть различия в адсорбционной способности этих НЧ по отношению к ионам Pb²⁺ и Cd²⁺.

Для проверки данной гипотезы нами был предложен эксперимент *in vitro*, характеризующий возможность адсорбции ионов Pb²⁺ и Cd²⁺ на НЧ в модельной системе. Растворы солей Pb и Cd, взятых в известных начальных концентрациях инкубировали с суспензией НЧ SiO₂ (300 м²/г), НЧ TiO₂ и НЧ Al₂O₃ в условиях, имитирующих среду тонкой кишки (37°C; 0,05 М Na-бикарбонатный буфер, pH 8,0). По окончании инкубации наночастицы с адсорбированными ионами Pb²⁺ и Cd²⁺ отделяли центрифугированием и в надосадочной жидкости определяли фактические (остаточные, после установления адсорбционного равновесия) количества обоих металлов.

На основании полученных результатов рассчитывали адсорбцию ионов Pb²⁺ и Cd²⁺ по формуле:

$$A=(C_{\text{нач}}-C)/C_N \quad (1),$$

где A- адсорбция, мкмоль/мг;

C_{нач}- начальная концентрация элемента в растворе, мкмоль/дм³;

C - остаточная (равновесная) концентрация элемента в надосадочной жидкости, мкмоль/дм³;

C_N – массовая концентрация НЧ, мг/дм³.

Для оценки параметров адсорбции ионов металлов на НЧ использовали модель изотермы однослойной, полностью обратимой адсорбции Лэнгмюра:

$$A=((A_{\text{max}}*C)/(b+C) \quad (2),$$

где A_{max} – максимальная предельная адсорбция, соответствующая насыщению адсорбционного слоя, мкмоль/мг;

b – константа нестойкости связывания (концентрация 50%-связывания), мкмоль/мг.

A_{max} и b представляют собой искомые параметры адсорбции.

В двойных обратных координатах 1/C (ось абсцисс), 1/A (ось ординат) уравнение изотермы адсорбции (2) приобретает вид:

$$1/A=(b/A_{\text{max}})*1/C + 1/A_{\text{max}} \quad (2a)$$

Отсюда находим параметры адсорбции как

$$A_{\max}=1/Y_0 \quad (3)$$

$$b=A_{\max} * \operatorname{tg}\alpha \quad (4),$$

где Y_0 - свободный член уравнения линейной регрессии в двойных обратных координатах $X=1/C$; $Y=1/A$;

$\operatorname{tg}\alpha$ - угловой коэффициент уравнения линейной регрессии.

В таблицах 49, 50 представлены равновесные концентрации Pb и Cd в надосадочных жидкостях исследуемых проб для ряда значений $C_{\text{нач}}$ и рассчитанные величины A , $1/A$ и $1/C$, использованные при построении регрессионных зависимостей.

Таблица 49 – Адсорбция свинца на трех видах наночастиц

Pb+НЧ SiO ₂ (300 м ² /Г)							
$C_{\text{(нач)}}$	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625
C	6,337	11,130	10,986	10,599	10,070	6,031	2,620
A	243,6630	113,8699	51,5140	20,6514	5,5550	1,7818	1,2858
1/A	0,0041	0,0088	0,0194	0,0484	0,1800	0,5612	0,7777
1/C	0,1578	0,0898	0,0910	0,0944	0,0993	0,1658	0,3816
Pb+НЧ TiO ₂							
$C_{\text{(нач)}}$	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625
C	4,247	10,456	12,435	6,421	2,607	1,870	0,868
A	245,7526	114,5443	50,0653	24,8294	13,0177	5,9424	3,0381
1/A	0,0041	0,0087	0,0200	0,0403	0,0768	0,1683	0,3292
1/C	0,2354	0,0956	0,0804	0,1557	0,3835	0,5347	1,1518
Pb+Al ₂ O ₃							
$C_{\text{(нач)}}$	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625
C	5,274	5,834	6,499	4,415	1,463	0,419	0,117
A	244,7261	119,1663	56,0006	26,8348	14,1623	7,3932	3,7896
1/A	0,0041	0,0084	0,0179	0,0373	0,0706	0,1353	0,2639
1/C	0,1896	0,1714	0,1539	0,2265	0,6836	2,3850	8,5699

Таблица 50 – Адсорбция кадмия на трех видах наночастиц

Cd+ НЧ SiO ₂ (300 м ² /Г)						
$C_{\text{(нач)}}$	1000	500	100	50	10	1
C	1005,626	43,050	0,393	0,062	0,056	0,446
A	-5,626	456,950	99,607	49,938	9,944	0,554
1/A	-0,1777	0,0022	0,0100	0,0200	0,1006	1,8052
1/C	0,0010	0,0232	2,5441	16,1209	18,0111	2,2419
Cd+НЧ TiO ₂						
$C_{\text{(нач)}}$	1000	500	100	50	10	1
C	980,624	229,180	0,192	0,047	0,042	0,173
A	19,376	270,820	99,808	49,953	9,958	0,827
1/A	0,0516	0,0037	0,0100	0,0200	0,1004	1,2096
1/C	0,0010	0,0044	5,2193	21,4457	24,0747	5,7711
Cd+НЧ Al ₂ O ₃						
$C_{\text{(нач)}}$	1000	500	100	50	10	1
C	986,229	28,116	0,051	0,022	0,015	0,056

A	13,771	471,884	99,949	49,978	9,985	0,944
1/A	0,0726	0,0021	0,0100	0,0200	0,1002	1,0590
1/C	0,0010	0,0356	19,7662	45,9134	66,4762	17,9556

В Таблице 51 приведены расчетные величины параметров адсорбции, а на рисунках 9-14 уравнения изотерм адсорбции в двойных обратных координатах.

Таблица 51 – Изотермы адсорбции A_{\max} и b в двойных обратных координатах

	Тип наночастиц		
	НЧ TiO ₂	НЧ Al ₂ O ₃	НЧ SiO ₂
Pb ²⁺	$A_{\max}=11,3$ 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
Cd ²⁺	$A_{\max}= 0,16$ мкмоль/ дм ³ $b= 10,72$ мкмоль/мг	$A_{\max}= 0,067$ мкмоль/дм ³ $b= 12,45$ мкмоль/мг	$A_{\max}= 0,24$ мкмоль/дм ³ $b= 12,19$ мкмоль/мг

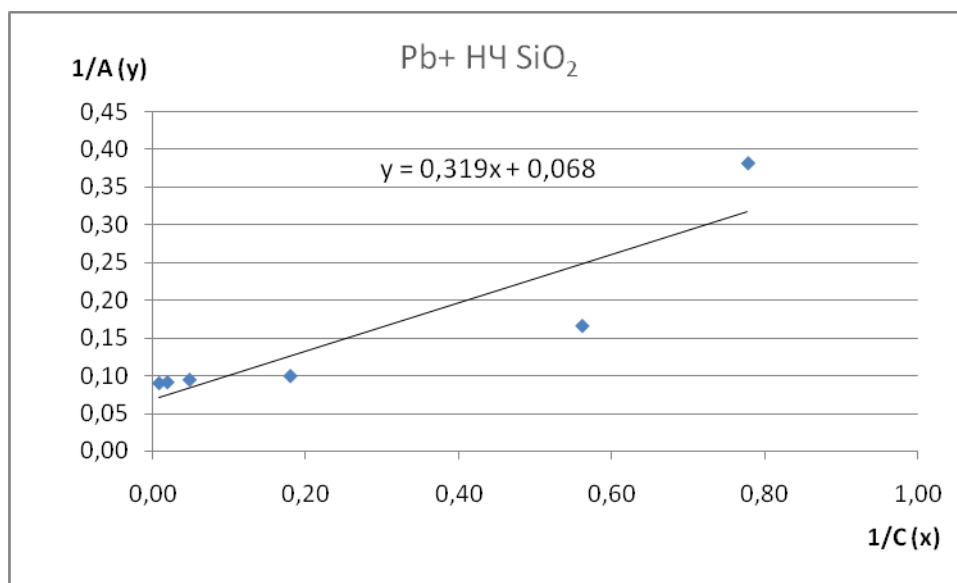


Рисунок 9 – Изотерма адсорбции свинца на НЧ SiO₂ (300 м²/г)

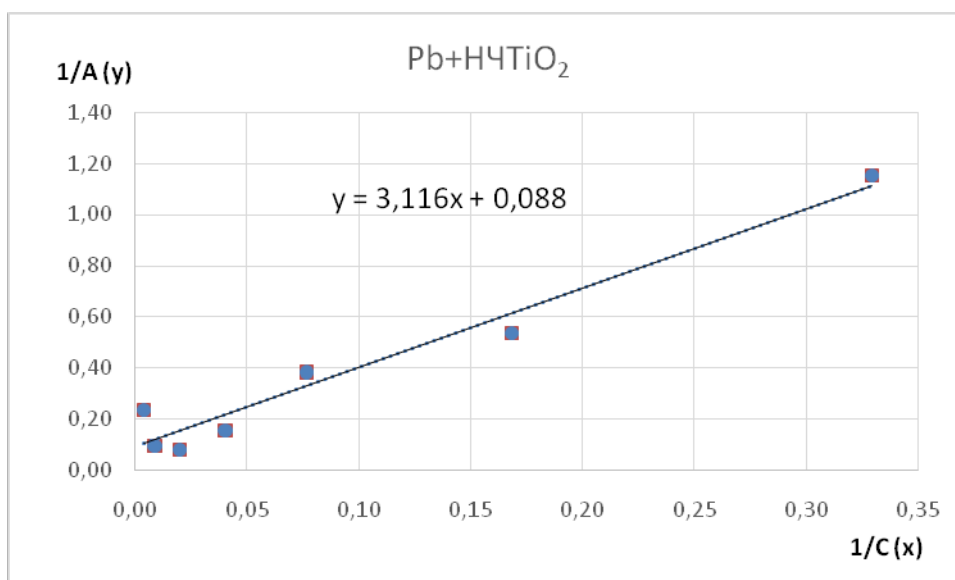


Рисунок 10 – Изотерма адсорбции свинца на НЧ TiO₂

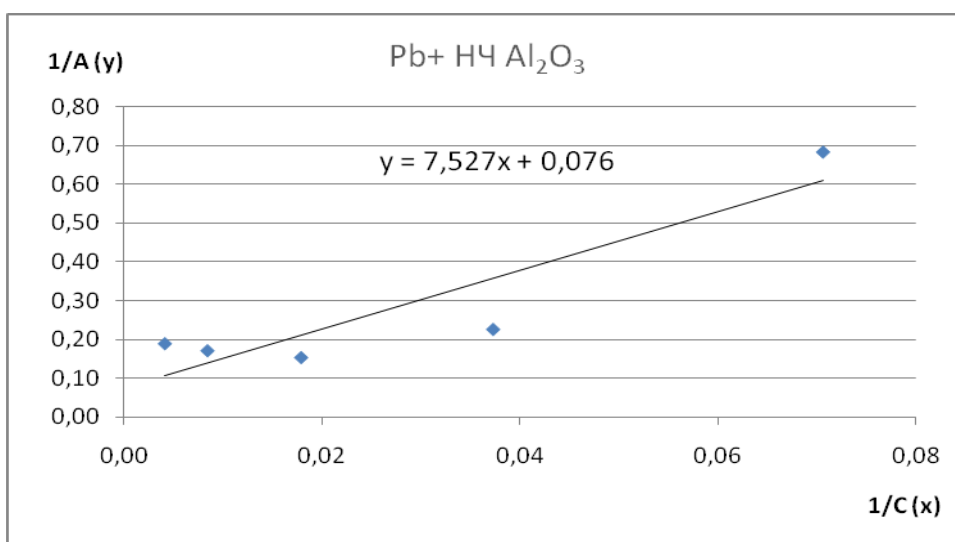


Рисунок 11 – Изотерма адсорбции свинца на НЧ Al₂O₃

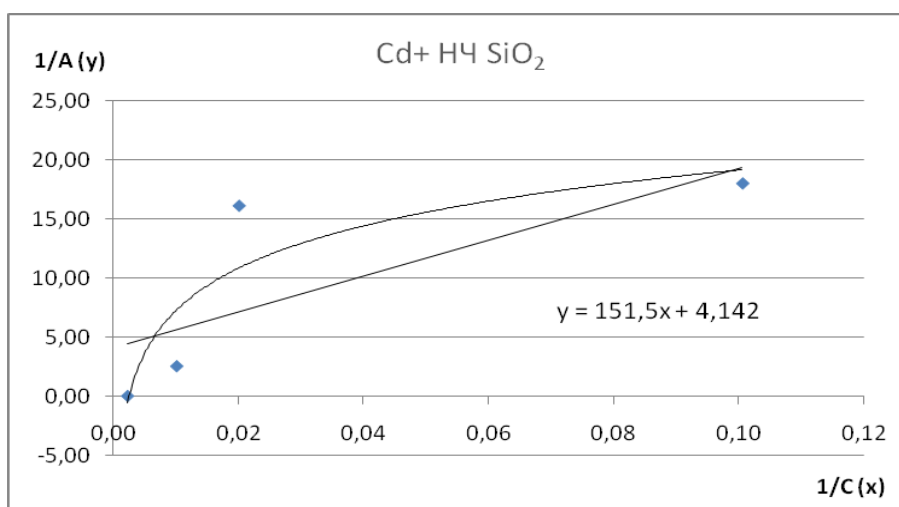


Рисунок 12 – Изотерма адсорбции кадмия на НЧ SiO₂ (300 м²/г)

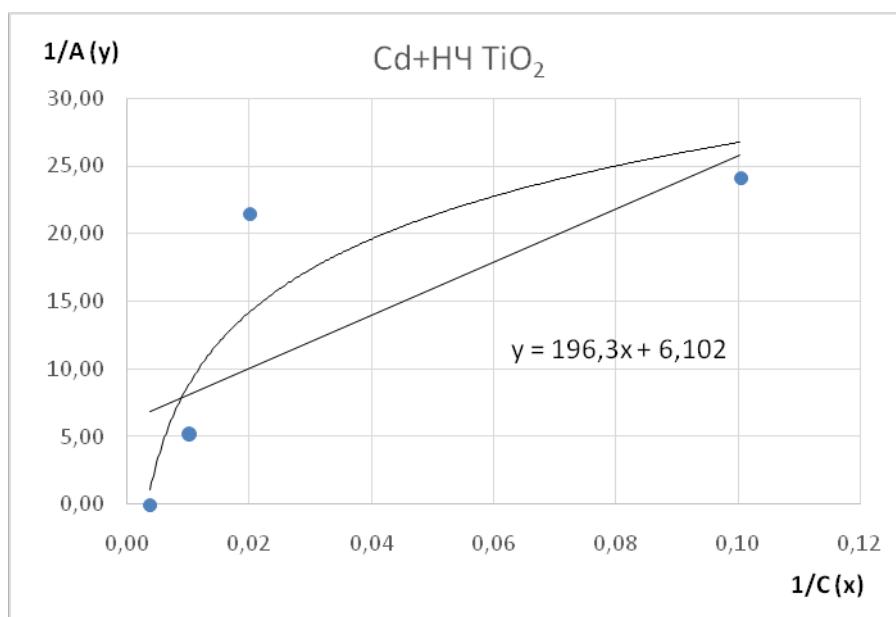


Рисунок 13 – Изотерма адсорбции кадмия на НЧ TiO₂

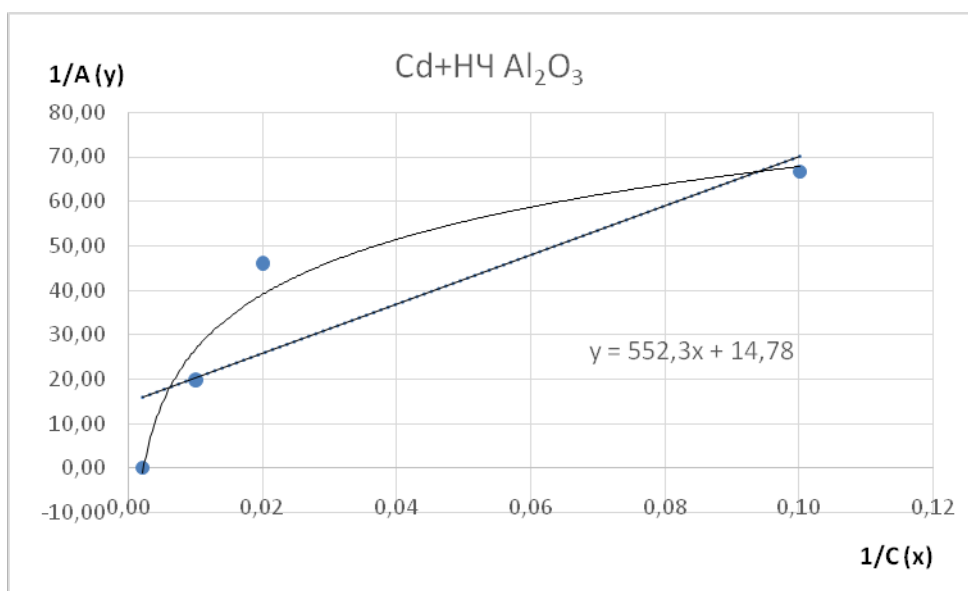


Рисунок 14 – Изотерма адсорбции кадмия на НЧ Al₂O₃

В результате исследований показано, что в случае адсорбции Pb²⁺ на НЧ TiO₂, НЧ SiO₂ и НЧ Al₂O₃ в пределах точности определения выполняется уравнение однослойной равновесной изотермы адсорбции по Ленгмюру (2).

Максимальная адсорбция Pb²⁺ на трех видах НЧ различается незначительно. Вместе с тем, прочность связывания (сродство), являющейся 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 прочное связывание ионов Pb²⁺ с НЧ с их удерживанием в просвете кишки. В случае использования НЧ Al₂O₃ связывание Pb²⁺ с ними оказывается менее прочным, что создает условия для динамического равновесия адсорбции-

десорбции в процессе всасывания Pb^{2+} в свободном и/или связанном виде с НЧ виде через кишечную стенку. Пара Pb^{2+} /НЧ TiO_2 в этом отношении занимает промежуточное положение.

Как видно из Рисунков 12-14 в случае адсорбции Cd^{2+} 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, константы b и A_{max} уравнения (2) не могут быть корректно определены. Причина этого, по-видимому, состоит в том, что процесс связывания ионов Cd^{2+} на изученных видах НЧ не подчиняется модели однослойной, полностью обратимой адсорбции. Возможно, что вследствие различия в строении внешних электронных оболочек ионов Pb^{2+} и Cd^{2+} 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 Cd^{2+} на НЧ является, в отличие от Pb^{2+} , многослойной. Эти обстоятельства также могут создавать условия для переноса дополнительных количеств Cd^{2+} в форме, связанной с НЧ, через кишечный барьер.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В задачи настоящей работы входило изучение влияния искусственных НЧ и НМ на бионакопление и биораспределение микроэлементов при использовании модельных токсикантов обычной размерности (свинца и кадмия) в экспериментах *in vivo* длительностью от 21 до 28 дней.

При проведении экспериментов по изучению сочетанного действия НЧ и Рb одними из основных изучаемых показателей были выбраны такие специфические интегральные показатели, как прирост массы тела, относительные массы внутренних органов, концентрация Hb в крови, суточная экскреция 5-АЛК и порфибилиногена с мочой, а также содержание Рb и других микроэлементов в органах. Изменение показателей порфиринового обмена, наряду с нарушением нервно-мышечной проводимости [41], относится к специфическим критериям свинцовой интоксикации.

При проведении экспериментов по изучению сочетанного действия Cd и наноматериалов (НЧ TiO₂, НЧ SiO₂ (300 м²/г), фуллеренол C₆₀(ОН)₂₄) изучали прирост массы тела, относительные массы внутренних органов, содержание Cd и других микроэлементов в органах.

Влияние НЧ TiO₂ на действие Рb

В эксперименте при совместном введении Рb и НЧ TiO₂ было выявлено снижение концентрации Hb в крови с возрастанием дозы НЧ TiO₂, что может свидетельствовать о влиянии НЧ TiO₂ на усиление токсичности свинца. На это же указывает и увеличение у животных, получавших НЧ TiO₂ активности ЩФ сыворотки крови, что сопровождалось также снижением количества лимфоцитов и тромбоцитов в крови, а также достоверным увеличением количества гепатоцитов, находящихся в ранней стадии апоптоза, в печени животных, получавших Рb и НЧ TiO₂ в обеих дозах, по сравнению с животными, получавшими только Рb [50].

В печени имелась тенденция (хотя и не достоверная) накопления свинца, что коррелирует со снижением концентрации Hb в крови и может свидетельствовать об увеличении поступления свинца в организм и, соответственно, увеличении его токсичности при его совместном поступлении с НЧ TiO₂. На наличие у НЧ TiO₂ подострой пероральной токсичности ранее указывалось в работах [35; 45; 75; 105].

Что же касается взаимодействия НЧ TiO₂ с ионами Рb²⁺, то в нем основную роль играет, по-видимому адсорбция в просвете кишки, что, при определенной, достаточно высокой дозе НЧ, ввиду очень низкой всасываемости, приводит к снижению биодоступности и

бионакопления Pb. По-видимому, НЧ TiO₂ 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, по-видимому, имеет место печеночно-кишечная рециркуляция свинца и, возможно предположить, что определенное количество свинца элиминируется из печени, вновь адсорбируется на НЧ TiO₂ в просвете кишечника и быстрее во времени выводится из организма.

Полученные результаты могут указывать на возможное проявление независимого эффекта, обусловленного воздействием НЧ TiO₂. Несмотря на крайне ограниченную способность оксидных НЧ, таких, как НЧ TiO₂, проникать через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, как это было показано с использованием радиоактивных индикаторов [5] и электронной микроскопии [32], можно предположить, что всасывание этих НЧ в небольших количествах все же имеет место.

Влияние НЧ SiO₂ (двух видов) на действие Pb

Как показали результаты проведенных исследований при совместном введении Pb и стандартизованного препарата НЧ SiO₂ с площадью поверхности 220 м²/г, в течение первых 7 дней эксперимента животные, получавшие НЧ SiO₂, характеризовались большей прибавкой массы тела, а в дальнейшем у них отмечалась достоверно меньшая ОМ печени, увеличение концентрации Hb в крови, а также некоторое снижение активности ЩФ (по данным исследования [50]) и достоверное снижение экскреции 5-АЛК, что свидетельствует, по-видимому, об ослаблении тяжести свинцовой интоксикации. На это же указывают и данные [50], показывающие увеличение количества эритроцитов в крови и показателя гематокрита. Вместе с тем, определение Pb в органах (печень, почки, селезенка, семенники, головной мозг) не показали увеличения его накопления при его совместном введении с НЧ SiO₂.

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 Pb. 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 большей степени.

При введении животным совместно с Pb НЧ SiO₂ с удельной площадью поверхности 300 м²/г, то есть имеющих существенно меньший размер, чем первый из изученных образцов диоксида кремния (220 м²/г), также не было установлено однозначных свидетельств

потенцирования неблагоприятных эффектов при совместном поступлении с Pb. В группах животных, получавших Pb и НЧ SiO₂ в наибольшей дозе, наблюдалось достоверное снижение прироста массы тела за 28 дней ($p_{1-6} < 0,05$), что не отмечалось при введении как НЧ, так и Pb по отдельности. Увеличение ОМ почек и семенников ($p_{1-4,1-5,1-6} < 0,05$) во всех группах, получавших Pb, не зависело от дозы НМ и, по-видимому, не было с ним связано. Экскреция 5-АЛК с мочой у животных 4-ой группы, получавших Pb, многократно и достоверно увеличивалась по сравнению с животными 1-ой группы ($p_{1-4} < 0,05$), что является характерным признаком воздействия свинца на организм. Аналогичная динамика была отмечена и в отношении экскреции в мочой порфобилиногена. При этом также не было обнаружено зависимости экскреции 5-АЛК и порфобилиногена от дозы вводимых НЧ SiO₂

Вместе с тем следует отметить, что введение НЧ SiO₂ в определенной степени «отменяло» неблагоприятные эффекты, вызванные поступлением Pb, такие как установленные в исследовании [51] изменения активности аспаратаминотрансферазы (АСТ), которая увеличивалась у животных 4-ой и 5-ой группы, получавших Pb и Pb с низкой дозой НЧ SiO₂, соответственно, по сравнению с 1-ой группой (контрольной), но у животных 6-ой группы, получавших в сочетании с Pb наибольшую дозу НЧ SiO₂, изменение активности АСТ возвращалось на уровень показателя у контрольной группы животных ($p_{4-5,4-6} > 0,05$).

Отдельно стоит отметить обнаруженный эффект, вызванный введением НЧ SiO₂ с удельной площадью поверхности 300 м²/г в отношении концентрации Hb в крови. Введение только НЧ SiO₂ приводило к достоверному ($p_{1-3} < 0,05$) увеличению на 15% содержания Hb в крови у животных 3-й группы. У крыс 4-ой группы, получавших Pb, как и следовало ожидать, отмечалось достоверное ($p_{1-4} < 0,05$) снижение концентрации Hb в крови. Дополнительное введение крысам, получавшим Pb, НЧ SiO₂ 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 Pb и НЧ SiO₂ другой размерности (220 м²/г). Сравнивая результаты двух экспериментов с использованием НЧ SiO₂ различной дисперсности можно констатировать, что совместное введение Pb и НЧ SiO₂ несколько нивелирует эффект снижения содержания Hb в крови под влиянием свинца. Этот эффект, по-видимому, может быть объяснен как размерностью НЧ SiO₂ (на что указывает и проведенный однофакторный анализ в обоих экспериментах), так и, возможно, с дозой используемых НЧ.

Полученный результат согласуется с данными [51] в отношении гематологических показателей и апоптоза гепатоцитов. Установленные при этом неблагоприятные эффекты (снижение показателя гематокрита, среднего объема эритроцита, среднего содержания

гемоглобина в эритроците, средней концентрации гемоглобина в эритроците) в полной мере относились к проявлению токсического действия Pb ($p_{1-4} < 0,05$) и отсутствовали у животных, дополнительно получавших НЧ SiO₂ ($p_{4-5,4-6} > 0,05$). Изучение лейкоцитарной формулы крови (количество лейкоцитов, содержание нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов) и показателей тромбоцитов не выявило каких-либо эффектов как со стороны Pb, так и совместного введения Pb и НЧ SiO₂ при данных дозах и длительности воздействия.

Изучение распределения Pb 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 использованного препарата НЧ SiO₂ (300 м²/г) не происходило дальнейшего накопления токсиканта во всех изученных органах ($p_{4-5,4-6} > 0,05$).

С учетом известных эффектов Pb в отношении гомеостаза большого числа эссенциальных и токсичных элементов [1; 36], представляло интерес исследование микроэлементного профиля органов крыс, получавших НЧ SiO₂ и свинец в различных дозах. Как показал анализ полученных данных, 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 Pb, и не показывало зависимости от дозы введенных НЧ SiO₂. Введение НЧ SiO₂ не приводило, во всяком случае, к усилению накопления в печени таких токсичных элементов, как Cd и As, и к снижению тканевых запасов 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 ткани печени оказывается даже достоверно выше (хотя и незначительно по абсолютной величине) у животных, получавшей наибольшую дозу НЧ SiO₂ по сравнению с контрольной группой ($p_{1-3} < 0,05$). Единственным предположительно неблагоприятным воздействием на микроэлементный 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 сочетанном действии НЧ SiO₂ и Pb в настоящее время не вполне понятно и требует проведения дополнительных исследований. При этом важно подчеркнуть, что в мозгу животных, то есть в органе, являющемся по современным представлениям основной мишенью токсического действия алюминия [157], этот эффект не наблюдался.

Содержание микроэлементов в почках не изменяется при свинцовой интоксикации ($p_{1-4} > 0,05$) при сравнении с животными группы 1, получавшими деионизованную воду, за исключением Se. Совместное введение Pb и НЧ SiO₂ приводило к достоверному снижению содержания этого эссенциального микроэлемента в почках (эффект был связан с поступлением

Pb, но не НЧ SiO₂), чего не наблюдалось в печени и головном мозге. Содержание в головном мозге других изученных элементов не изменялись по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, на основании всей совокупности полученных данных в отношении сочетанного действия различных форм НЧ SiO₂ и Pb 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, а также в стабилизации, или даже в тенденции к снижению, экскреции 5-АЛК и порфобилиногена с мочой. Вместе с тем, эффект энтеросорбции Pb на НЧ SiO₂ не был подтвержден в наших исследованиях прямым образом (то есть по снижению содержания свинца в органах) в отличие от того, как это имело место для НЧ TiO₂. Последнее, как можно предположить, связано с различиями в адсорбционной активности использованных НМ различного химического состава. 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.

Эффекты сочетанного действия Pb и НЧ Al₂O₃

«Картина» явлений, наблюдаемых при пероральном введении НЧ Al₂O₃ на фоне свинцовой интоксикации, оказывается существенно иной по сравнению с совместным введением Pb с НЧ SiO₂ и НЧ TiO₂. Было установлено, как возрастание бионакопления Pb в печени, так и дополнительные воздействия НЧ на некоторые биомаркеры, связанные с его токсичностью.

ОМ почек достоверно увеличивалась у животных при введении Pb ($p_{1-2} < 0,05$), и продолжала увеличиваться по мере возрастания дозы вводимых НЧ Al₂O₃ ($p_{1-2,1-3,1-4} < 0,05$). ОМ селезенки увеличивалась у животных, получавших Pb и возрастающие дозы НЧ Al₂O₃. Однако, достоверными эти изменения были только для групп 2 и 4 ($p_{1-2,1-4} < 0,05$), то есть монотонная зависимость от дозы вводимых НЧ Al₂O₃ отсутствовала.

Экскреция 5-АЛК и порфобилиногена с мочой животных, получавших Pb (2-я, 3-я и 4-я группы), 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 ($p_{2-3,2-4,3-4} > 0,05$). Результаты определения Hb в крови, показали, что его концентрация достоверно снижалась у всех животных, получавших Pb, 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 ($p_{2-3,2-4} > 0,05$), а концентрация Hb в крови у животных, которым вводили Pb и НЧ Al₂O₃ была практически одинаковой с животными, которые получали только Pb.

Исследования гематологических показателей крови крыс и апоптоза гепатоцитов, [52] показали наличие неблагоприятных изменений у животных 2-й группы, получавших Pb, по сравнению с показателями животных контрольной группы. Так, у них выявлено снижение среднего объема эритроцита, среднего содержания Hb в эритроците, средней концентрации Hb в эритроците ($p_{1-2}<0,05$), что характеризует действие Pb на организм [52]. У животных, получавших НЧ Al₂O₃ на фоне свинцовой интоксикации, выявлено выраженное в той же степени снижение в сравнении с контролем среднего содержания Hb в эритроците и средней концентрации Hb, а также, в отличие от животных 2-й группы, уменьшение показателя гематокрита ($p_{1-3,1-4}<0,05$) [52]. Влияние НЧ на этот показатель подтверждалось данными факторного анализа ($p<0,05$, ANOVA по фактору наличия НЧ Al₂O₃) [52]. Таким образом, токсическое действие Pb на кровь при введении НЧ Al₂O₃ по ряду основных показателей не ослабляется, а в случае показателя гематокрита даже усугубляется. Как было показано в этой же работе [52], в 4-й группе животных высокая доза НЧ Al₂O₃ на фоне введения Pb приводила к достоверному снижению количества моноцитов в общем числе клеток ($p_{2-4}<0,05$). При сочетанном введении Pb с НЧ Al₂O₃ отмечалась также тенденция к увеличению числа клеток на ранних стадиях апоптоза (на 25% в 3-й группе), некротических клеток (на 80% в 4-й группе) и снижению числа живых клеток (на 1,3% в 3-й группе) [52]. Значимость изменений статистически подтверждались однофакторным дисперсионным анализом ($p<0,05$, ANOVA по фактору наличия НЧ) только в случае количества живых клеток и клеток на ранней стадии апоптоза. Однако, все указанные изменения не имели четко выраженной зависимости от дозы вводимых НЧ Al₂O₃.

Биохимические исследования сыворотки крови животных рассматриваемых групп, [52] показали повышение уровня глюкозы у животных 3-й и 4-й групп, получавших Pb и НЧ Al₂O₃, по сравнению с животными 2-й группы, получавшими только Pb ($p_{2-3}<0,05$ по критерию Манна-Уитни). При этом повышение концентрации глюкозы у животных 4 группы было довольно значительным (32%) и даже выходило за пределы физиологической нормы. Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние НЧ Al₂O₃ на этот показатель ($p<0,05$, ANOVA). Аналогичная тенденция изменения уровня глюкозы была выявлена для сочетанного действия Pb и НЧ SiO₂ (220 м²/г), но в случае НЧ Al₂O₃ этот эффект был значительно более выраженным.

Изучение распределения Pb в печени, почках, селезенке и головном мозге показало его многократное и достоверное увеличение у животных группы 2, которым вводили Pb, по сравнению с животными контрольной группы ($p_{1-2}<0,05$), при этом в отношении накопления Pb в печени имел место дозозависимый эффект. Увеличение содержания Pb в семенниках было

значительно менее заметным. Следует отметить тот факт, что, в отличие от печени, совместное введение Pb и НЧ Al₂O₃ в разных дозах не приводило к дальнейшему накоплению Pb в почках, семенниках и головном мозге, по сравнению с животными, которым вводили только Pb.

Таким образом, предполагаемый эффект усиления биодоступности и, соответственно, токсичности ионов тяжёлых металлов вследствие их транспорта через биологические барьеры в связанной с НЧ форме [67], находит подтверждение для частного случая взаимодействия Pb с НЧ Al₂O₃. Известные для НЧ Al₂O₃ эффекты не исключают возможности их частичного растворения в биологическом окружении с высвобождением как поверхностно связанных ионов Pb, так и растворимых форм Al⁺³. Таким образом, полученные результаты показывают, что НЧ Al₂O₃ присутствующие в качестве потенциальных контаминантов в пищевой продукции, способны усиливать бионакопление Pb и увеличивать его токсичность.

Эффекты сочетанного действия Cd и наноматериалов

При изучении сочетанного действия на организм крыс Cd и НМ на протяжении всех 28 дней эксперимента не наблюдалось изменений как в абсолютном, так и в относительном приросте массы тела во всех группах животных, летальности и признаков заболеваемости. Изучение содержания микроэлементов в органах животных 2-ой группы показало многократное возрастание Cd в печени на (4500%), в почках (на 3400%), и, в меньшей степени, в головном мозге (на 55%) по сравнению с животными 1-ой контрольной группы. Исследования гематологических показателей крови, апоптоза гепатоцитов, а также показателей клеточного звена иммунитета, выполненные Трушиной Э.Н. и Мустафиной О.К. [242], показали, что введение Cd в изученной дозе не влияет на показатели лейкоцитарной формулы крови животных. Однако, анализ содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), проведенный у животных рассматриваемых групп Г.Ю. Мальцевым [53], показал достоверное повышение диеновых конъюгатов ПНЖК и малонового диальдегида у всех животных, получавших Cd в сравнении с контролем (независимо от введения тех или иных НМ). Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что у животных опытных групп наблюдалась субклиническая картина кадмиевой интоксикации, не приводившая при данных сроках эксперимента, к выраженным патологическим изменениям в организме.

Изучение влияния НМ на накопление Cd в органах и тканях показало достоверное увеличение его содержания в печени крыс, получавших НЧ SiO₂, наиболее заметное при высокой дозе НМ. В остальных органах (почки, головной мозг) прослеживалась только недостоверная тенденция к росту содержания Cd на фоне приема данного вида НЧ, причем только при их низкой дозе. Достоверного влияния НЧ TiO₂ на накопление Cd выявлено не

было, а фуллеренол достоверно усиливал накопление элемента в печени только при низкой дозе. Эти данные подтверждают предположение о том, что в определенных случаях накопление Cd может быть повышено за счет усиления его проникновения через биологические барьеры организма под воздействием НЧ, однако данный эффект зависит как от природы НМ, так и от используемой биологической модели. Так, по данным [108] НЧ TiO₂ усиливали накопление Cd рыбами, что не наблюдалось в наших исследованиях при совместном введении обоих веществ в ЖКТ теплокровных животных. С другой стороны, в отношении Cd при использованных нами условиях эксперимента не выявлено какого-либо снижения бионакопления, подобного тому, которое имело место при взаимодействии НЧ TiO₂ с Pb и могло быть объяснено эффектом энтеросорбции (удержания) Pb²⁺ в полости кишки. Pb²⁺ и Cd²⁺, как известно, имеют близкие ионные радиусы и структуру сольватных оболочек. Однако, механизмы их кишечной абсорбции могут различаться. В частности, как было показано в работе [65] нокаун гена транспортера двухвалентных катионов DMT1 в монослоях клеток Caco-2, являющихся адекватной моделью тонкокишечного эпителия, приводит к резкому ослаблению проникновения через них ионов Cd²⁺ и Fe²⁺, но не Pb²⁺. По мнению авторов цитируемой статьи за всасывание последнего в клетки отвечает неспецифический механизм, опосредуемый потоком ионов водорода. Сродство (аффинность) такого транспортного механизма может быть значительно меньшим, чем в случае транспорта Cd²⁺, ввиду чего насыщение транспортного пути для Pb²⁺ достигается при значительно большей концентрации его ионов в просвете кишки в сравнении с Cd²⁺ и рядом других двухвалентных катионов, что делает в результате всасывание Pb²⁺ более чувствительным к эффекту сорбции на НЧ. Что же касается Cd²⁺, то для величины его абсорбции более важным фактором является поступление других двухвалентных металлов, в частности, железа, способного вызвать снижение экспрессии гена DMT1 и, как следствие, уменьшение всасываемости Cd [254].

Введение животным Cd, в том числе совместно с изученными НЧ/НМ, приводило к разнонаправленным эффектам в отношении изменения уровней токсичных, эссенциальных и условно эссенциальных микроэлементов. Так, наблюдалось снижение содержания Pb в печени животных, получавших на фоне кадмиевой интоксикации НЧ SiO₂ и фуллеренол в низких дозах, а также НЧ TiO₂ в высокой дозе. Зависимость данного эффекта только от дозы TiO₂ согласуется с установленным нами эффектом подавления абсорбции этого металла в присутствии НЧ TiO₂, предположительно, по механизму энтеросорбции. Что же касается НЧ SiO₂ и фуллеренола, то их возможное влияние на обмен Pb реализуется по иному механизму, однако для выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Уровень Zn в печени недостоверно возрастал у животных, получавших Cd, однако это различие увеличивалось и становилось статистически достоверным, если одновременно с Cd животные получали НЧ SiO₂ (в высокой дозе), НЧ TiO₂ (только в низкой дозе) и фуллеренол (независимо от дозы). Накопление Zn в почках в той или иной степени возрастало у всех животных, получавших Cd, причем достоверно - в группе без НЧ (2-ая группа), при поступлении высоких доз фуллеренола, SiO₂ и обеих доз TiO₂. В головном мозге значимых эффектов в накоплении Zn выявлено не было, за исключением снижения его содержания при высокой дозе фуллеренола. Полученный результат качественно согласуется с данными работы [103], в которой была выявлена положительная корреляция в накоплении Cd и Zn в печени овец. Эффект взаимодействия на системном уровне микроэлементов Zn и Cd известен из литературы и связан с усилением под действием ионов Cd имеющей протективное значение экспрессии транспортного белка металлотионеина, связывающего этот токсикант, и, одновременно, являющегося акцептором и переносчиком Zn и ряда других двухвалентных катионов [123]. Изменения в бионакоплении Cd, вызываемые использованными НЧ, в особенности, SiO₂, способны, как следует из данных эксперимента, повлиять 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 Cd (группа 2) и его комбинации с низкими дозами НЧ TiO₂ и 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 одновременно с высокой дозой НЧ SiO₂. Как следует из данных литературы, взаимодействие Cu и Cd наблюдается в ряде биологических систем (в экспериментах на рыбах [214; 149] и овцах [103]), причем имеет органоспецифический характер. В частности, в работе [103] введение Cd овцам приводило к усилению накопления Cd в почках и селезенке, но не в печени животных, что качественно согласуется с данными, полученными в нашей работе. Дополнительное введение НЧ, как показывают полученные нами результаты, существенно влияет на взаимодействие Cd и Cu в организме.

Накопление Mn достоверно возрастало в головном мозгу в группах 3 и 4 (Cd+ НЧ SiO₂) по сравнению с животными 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 [195]. В печени накопление Mn увеличивалось в результате поступления Cd 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 и выявленный у животных рассматриваемых групп [53].

В числе других эффектов сочетанного воздействия Cd и НЧ на бионакопление элементов - достоверно увеличение накопления в печени As в группе 4 (высокая доза НЧ SiO₂), мышьяка в почках в группе 8 (высокая доза фуллеренола), никеля в почках в группе 3 (низкая доза НЧ SiO₂). Все эти эффекты были относительно невелики по абсолютной величине и не проявлялись при действии Cd как такового (группа 2), то есть могли быть соотнесены исключительно с приемом НЧ.

Таким образом, в результате исследований по изучению совместного поступления Cd и трех видов НМ на бионакопление эссенциальных и токсичных элементов в органах и тканях было выявлено большое число эффектов, характеризуемых 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 (последнее по данным литературы [178] способно привести к усугублению оксидантного стресса и обладает определенным канцерогенным потенциалом);
- 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 сочетанного воздействия Cd 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 окружающей среде в крайне малых дозах. Нарушение микроэлементного гомеостаза, вызванного совместным действием Cd и НЧ/НМ, может иметь различные побочные эффекты,

такие как ингибирование Т-клеточного звена иммунитета. Так, согласно данным, [242], введение НЧ SiO₂ и рутила в низких дозах совместно с Cd снижает количество лимфоцитов и увеличивает количество нейтрофилов. Наиболее выраженные изменения, характеризующиеся уменьшением числа Т-хелперов и повышением Т-цитотоксических клеток с соответствующим уменьшением индекса ИРИ имели место у животных, получавших высокую дозу рутила на фоне кадмиевой интоксикации. Существенно, что данный эффект не наблюдался у животных, получавших рутил в этой же дозе и не подвергавшихся кадмиевой интоксикации [35].

Таким образом, в результате изучения влияния искусственных НЧ на показатели биораспределения токсичных элементов по органам, а также ряд биомаркеров их токсического действия, показано наличие как синергических, так и антагонистических эффектов различных видов НЧ при их взаимодействии с Cd.

Полученные данные по взаимодействию НЧ различных типов с токсичными микроэлементами Pb и Cd следует учитывать при оценке агрегированных рисков, вызываемых этими факторами. Загрязненность объектов окружающей среды и пищевой продукции Pb и Cd является одной из приоритетных проблем современного профилактического здравоохранения. По данным [14; 55; 21] в Российской Федерации загрязненность свинцом значительной доли мясной и молочной продукции, кадмием - морепродуктов приближается к допустимым уровням (ДУ, согласно ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции») и в отдельных случаях может их превосходить, при том, что в случае Pb действующие в настоящее время международно-гармонизированные нормативы по условно переносимому недельному поступлению отозваны ЖЕСФА и имеют перспективы пересмотра в сторону дальнейшего снижения [113]. При наличии в пищевой продукции НЧ в дополнение к присутствующим токсическим элементам, содержащимся на уровнях, близких к порогу токсического действия, возможно развитие неблагоприятных эффектов, которые в противном случае (в отсутствие примесей наночастиц) могли бы не проявиться.

Возможные источники поступления НЧ в пищевую продукцию в настоящее время являются предметами дискуссии. НЧ TiO₂ и Al₂O₃ производятся в крупных масштабах (десятки тысяч тонн) современной промышленностью в виде сухих нанопорошков, суспензий и различных видов продукции и используются в качестве абразивов, носителей для катализаторов, пестицидов, катализаторов, УФ- фильтров и компонентов косметической продукции (TiO₂ в рутильной и анатазной формах). Область использования фуллеренов и их производных (включая фуллеренолы) включает электронную промышленность, производство фармацевтических препаратов с противовирусной активностью, косметическую продукцию.

Имеются находящиеся в той или иной степени внедрения разработки по использованию фуллеренов и фуллеренолов в качестве возможных пищевых добавок с антиоксидантным действием (хотя в настоящее время они всё ещё не прошли полный объем необходимых исследований и не допущены к использованию). Таким образом, в целом в настоящее время можно говорить только о непреднамеренной (случайной) контаминации пищевой продукции НЧ Al_2O_3 и TiO_2 и фуллеренолами, оценить которую в количественном отношении не представляется возможным ввиду отсутствия адекватных методов анализа этих НМ в пищевой продукции и объектах окружающей среды и соответствующих данных о их содержании в пищевой продукции. Полученные в нашей работе данные указывают на актуальность развертывания исследовательских работ в данном направлении.

Отдельного рассмотрения заслуживает вопрос о присутствии НЧ SiO_2 в пищевой продукции. Аморфный SiO_2 является широко используемой пищевой добавкой E551, выполняющей функции антислеживающего агента и носителя. Согласно ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» допускается использование SiO_2 в составе пряностей (не более 30 г/кг), продуктов, плотно обёрнутых фольгой (30 г/кг), продуктов сухих порошкообразных, включая сахарную пудру (10 г/кг), сыров и их заменителей (10 г/кг), соли и её заменителей (10 г/кг), ароматизаторов (50 г/кг). В таблетированных БАД к пище, сахаристых кондитерских изделиях (кроме шоколада) норматив содержания E551 не установлен и вносимые количества этой пищевой добавки устанавливаются технической документацией изготовителя. Помимо пищевой продукции SiO_2 используется в косметике, в зубных пастах и в качестве вспомогательного компонента в большом числе фармацевтических препаратов. В монографии JECFA [238] на данную пищевую добавку отсутствует информация о размере её частиц. На практике в составе пищевой продукции используются, как правило, два вида аморфного диоксида кремния: полученный путем дегидратации осажденной кремниевой кислоты (т.н. «силикагель» или «белая сажа») и пирогенный SiO_2 , получаемый газофазным гидролизом тетрахлорсилана в кислородно-водородном пламени (т.н. процесс «Аэросил®», запатентованный в 1949 году). Для первой из этих форм SiO_2 площадь удельной поверхности не превышает $175 \text{ м}^2/\text{г}$, то есть размер её частиц заведомо превышает 100 нм и она не может рассматриваться как НМ. Для второй из форм, в соответствии с действующим ГОСТ 14922-77 [11] предусмотрена удельная площадь поверхности 300 и $380 \text{ м}^2/\text{г}$ с соответствующим размером первичных частиц 5-20 и 5-15 нм, то есть все эти два вида «Аэросила» являются НМ, способными в определенных условиях, при диспергации в составе пищевой продукции давать наночастицы аморфного диоксида кремния.

Мировой объём производства наноразмерного аморфного диоксида кремния типа «Аэросил» превышает 25000 тонн, то есть около 40% всего мирового выпуска нанопорошков; значительная часть всего объёма этого вещества используется в пищевой и другой потребительской продукции. Поскольку в большинстве случаев производители не указывают на этикетках конкретную форму диоксида кремния, используемую в их продукции, его спецификацию (в частности, удельную площадь поверхности), практически невозможно установить, какая часть этого общего количества представлена наночастицами и, следовательно, оценить нагрузку на популяцию. По оценкам авторов работы [268] ежедневное поступление SiO_2 как пищевой добавки в организм человека может составлять 9,4 мг/кг м.т., в том числе 1,8 мг/кг.м.т. - в виде НЧ. Это близко к нижнему пределу оценки токсического действия (менее 100 мг/кг м.т.) для наноразмерного SiO_2 , установленного по данным работ [54; 49; 48; 47] с учетом соответствующих коэффициентов запаса, вносимых для экстраполяции результатов биологического эксперимента на человека. Таким образом, риск от совместного воздействия Cd , Pb и некоторых видов НЧ, содержащихся в пищевой продукции, при определенных условиях может быть значимым. Количественная оценка этого риска должна стать предметом отдельных исследований с учетом данных, полученных в настоящей работе.

В настоящей работе были получены данные, требующие дополнительных подтверждений, в частности, это относится к биораспределению и бионакоплению различных элементов в органах лабораторных животных. Для проверки данной гипотезы нами была предложена модель эксперимента *in vitro*, характеризующая всасывание НМ в кишечнике с одновременным присутствием ионов Pb^{2+} и Cd^{2+} .

В результате проведенных исследований было показано, что в случае адсорбции Pb^{2+} на НЧ TiO_2 , НЧ SiO_2 и НЧ Al_2O_3 выполняется уравнение однослойной равновесной изотермы адсорбции по Ленгмюру. Максимальная адсорбция Pb^{2+} на трех видах НЧ различается незначительно. Вместе с тем, прочность связывания (сродство), являющейся величиной, обратной по отношению к константе b , оказывается наибольшей в случае использования НЧ SiO_2 и наименьшей - в случае НЧ Al_2O_3 . Отсюда можно предположить, что в условиях *in vivo* в случае НЧ SiO_2 , слабо всасываемых в кишечнике, преобладает прочное связывание ионов Pb^{2+} с НЧ с их удерживанием в просвете кишки. В случае использования НЧ Al_2O_3 связывание Pb^{2+} с ними оказывается менее прочным, что создает условия для динамического равновесия адсорбции-десорбции в процессе всасывания Pb^{2+} в свободном и/или связанном виде с НЧ виде через кишечную стенку. Пара Pb^{2+} /НЧ TiO_2 в этом отношении занимает промежуточное положение.

В случае адсорбции Cd^{2+} на НЧ трех видов уравнение изотермы адсорбции Ленгмюра не выполняется (по-видимому имеет место гиперболическая зависимость). Поэтому константы b и A_{max} уравнения не могут быть корректно определены, по-видимому, в связи с тем, что процесс связывания ионов Cd^{2+} на изученных видах НЧ не подчиняется модели однослойной, полностью обратимой адсорбции. Возможно, что вследствие различия в строении внешних электронных оболочек ионов Pb^{2+} и Cd^{2+} связывание последних на поверхности НЧ является необратимым, т.е. сопровождается формированием более прочных, чем электростатическое взаимодействие, химических связей. Кроме того, не исключено, что адсорбция Cd^{2+} на НЧ является, в отличие от Pb^{2+} , многослойной.

Полученные данные согласуются с результатами экспериментов *in vivo*, проведенных в ходе данной работы:

- при совместном введении свинца и НЧ диоксида титана 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. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами в исследованиях *in vitro* и доказывают, что основную роль в эффектах влияния НЧ диоксида титана на бионакопление свинца играет его адсорбция на НЧ в просвете кишки;

- при изучении сочетанного действия свинца и НЧ оксида алюминия наблюдалось многократное и достоверное увеличение накопления свинца с возрастанием дозы НЧ оксида алюминия в печени крыс. Похожий эффект для селезенки являлся менее выраженным и выявлялся только при малой дозе НЧ. Для остальных органов и тканей введение различных доз НЧ оксида алюминия существенного влияния на бионакопление свинца не оказывало;

- при совместном введении свинца и НЧ диоксида кремния в обеих дозах не происходило увеличения накопления свинца во всех изученных органах.

В процессе выполнения настоящей работы были получены данные, в ряде случаев характеризующие увеличение токсичности модельных токсикантов (Pb и Cd) при их совместном поступлении с различными видами НМ. Так как различные контаминанты практически всегда присутствуют как в пищевой продукции, так и в объектах окружающей среды (воздух, вода) в самых различных концентрациях и сочетаниях, то можно ожидать, что они будут поступать в организм человека совместно с НМ, производство которых в мире из года в год увеличивается. В связи с этим существует реальная вероятность того, что при совместном поступлении в организм НМ и «традиционных» контаминантов (в частности, токсичных элементов), токсичность последних может изменяться. Это можно объяснить, в частности, тем, что НМ, имея обширную площадь поверхности и повышенную, в сравнении с

материалами обычной степени дисперсности, каталитическую, реакционную и сорбционную активность, могут определенным образом модифицировать токсическое действие контаминантов. Исходя из этого, можно предположить, как минимум, три сценария совместного воздействия НМ и химических контаминантов на организм. Первый: НМ довольно прочно связывают контаминанты в желудочно-кишечном тракте и такой комплекс становится недоступным (или малодоступным) для всасывания; в данном случае можно ожидать, что токсичность как самих НМ, так и контаминантов будет уменьшаться. Второй: образуемый в желудочно-кишечном тракте комплекс обладает частичной растворимостью и может проникать через биологические мембраны и /или физиологические барьеры организма; в данном случае НМ выполняют роль своеобразного проводника для контаминантов и, таким образом, увеличивается их проникновение во внутреннюю среду организма, тем самым токсичность контаминантов увеличивается. При этом следует иметь в виду, что увеличивается и проникновение в клетку и самих НМ, которые также могут обладать определенной токсичностью. Третий: НМ и контаминанты никак не взаимодействуют друг с другом, поэтому токсичность каждого из них определяется только его количеством и не зависит от количества другого компонента.

В принципе различные контаминанты и различные НМ могут поступать в организм совместно в самых разных сочетаниях и количествах. Предусмотреть все эти сценарии практически невозможно. С другой стороны, необходимо с токсикологической точки зрения оценить взаимодействие НМ с контаминантами для целей последующего регламентирования их допустимых уровней содержания в пищевой продукции. Поэтому целесообразна разработка нормативно-методического документа, в котором регламентируется порядок проведения токсикологических исследований при совместном поступлении в организм лабораторных животных НМ и контаминантов для получения сопоставимых данных. Принципиальными положениями являются:

- совместное введение НМ и контаминантов, что имеет место быть в реальных условиях. Их дозы должны рассчитываться таким образом, чтобы изучаемый химический контаминант вызывал развитие токсически значимые эффекты, а НМ поступали в различных дозах;

- продолжительность эксперимента. Как правило, в этих условиях, достаточная продолжительность эксперимента 21-23 дня. Однако, если изучаемый контаминант поступает не в агривированных дозах, то продолжительность эксперимента может быть увеличена до 3х месяцев. При этом, изучаемые контаминанты и НМ вводятся внутрижелудочно или в корм лабораторных животных с обязательной ежедневной регистрацией поедаемости корма, чтобы оценить их поступление в организм;

- список изучаемых показателей, наряду с интегральными, биохимическими и физиологическими показателями, должен включать изучение специфических биомаркеров. В случае, если специфические биомаркеры в литературе отсутствуют, то должен использоваться расширенный спектр исследований, направленный на определение специфических биомаркеров;

- обязательным является изучение распределения по органам и тканям не только самих исследуемых контаминантов и НМ (при наличии адекватных аналитических методов для определения последних), но и широкого круга токсичных элементов, макро- и микроэлементов, сродство НЧ и НМ к которым может быть выше, чем у исследуемого контаминанта.

Вышеизложенные методические подходы были реализованы в разработке 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.

5 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-аминолевуленовой 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-аминолевуленовой 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.

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-АЛК	5-аминолевуленовая кислота
ААС	Атомно-абсорбционная спектрометрия
АЛТ	Аланинаминотрансфераза
АРИПС	Автоматизированная распределенная информационно-поисковая система
АСМ	Атомно-силовая микроскопия
АСТ	Аспаратаминотрансфераза
ДРС	Динамическое рассеяние света
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ИРИ	Иммунорегуляторный индекс
ИСП-АЭС	Атомно-эмиссионная спектрометрия с индукционно-связанной плазмой
ИСП-МС	Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
МАИР	Международное Агенство по Изучению Рака
МТТ	Микротитрационный тест
НМ	Наноматериалы
НЧ	Наночастицы
ОВА	Овальбумин куриного яйца
ОМ	Относительная масса
ПБГ	Порфобилиноген
ПОЛ	Перекисное окисление липидов
ПР	Полусинтетический рацион
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РСК	Реакционно-способные формы кислорода
ТЭМ	Трансмиссионная микроскопия
УПНП	Условно переносимое недельное поступление
ЦНС	Центральная нервная система
ЩФ	Щелочная фосфатаза
Нь	Гемоглобин

7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина. – 1991. – 496 с.
2. Алексеева А. С. Влияние применения нетрадиционных органических удобрений на накопление тяжелых металлов и биологическую активность дерново-подзолистых супесчаных почв: дис. канд. биолог, наук / А. С. Алексеева. - М., 2002.- 145 с.
3. Арианова Е.А., Шумакова А.А., Тананова О.Н. и др. Влияние наночастиц диоксида титана на показатели иммунной системы у крыс// Вопросы питания. - 2012.- Т.84, № 6.- С.47-53
4. Биохимические методы исследования в клинике. Справочник /под ред. Покровского А.А. – М.: Медицина. – 1969. – 652 с.
5. Бузулуков Ю.П., Гмошинский И.В., Распопов Р.В. и др. Изучение абсорбции и биораспределения наночастиц некоторых неорганических веществ, вводимых в желудочно-кишечный тракт крыс, с использованием метода радиационных индикаторов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. - 2012. - Т.57, № 3. - С.5-12.
6. Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии // Под редакцией В.А. Тутельяна. – М. : Палея-М. – 2001. – 560 с.
7. Вредные вещества в промышленности: справочник для химиков, инженеров и врачей. — Т. 3: Неорганические и элементоорганические соединения / под ред. Н.В. Лазарева, И.Д. Гадаскиной. — Л. : Химия, 1977. — 608 с.
8. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Свинец / ВОЗ. — Женева, 1980. - 193 с.
9. Гмошинский И.В., Шипелин В.А. Хотимченко С.А. Наноматериалы в пищевой продукции и ее упаковке: сравнительный анализ рисков и преимуществ // Анализ риска здоровью. – 2018. – №4 . – С. 134-142.
10. Горшенёва Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам. Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2014. – №6(18). – С. 48-55.
11. ГОСТ 14922-77 «Аэросил. Технические условия»
12. ГОСТ 26929-94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения токсичных элементов».
13. ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов».

14. Журавлёва Н.И., Бубнов А.Г., Гриневич В.И. Экологический контроль уровня загрязнения свинцом и кадмием мяса и молока крупного рогатого скота // Безопасность в техносфере. – 2011. - №3. – С.13-19.
15. Егоров Ю.Л., Кириллов В.Ф. Экологическая значимость и гигиеническая регламентация свинца и кадмия в различных средах: Обзор литературы // Медицина труда и промышленная экология. - 1996. - № 10. - С. 18-25.
16. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В. Механизмы токсического действия неорганических соединений // «Медицина». – 1989.- 272 с., ил.
17. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н. и др. Токсикологическая оценка наноструктурного диоксида кремния. Параметры острой токсичности// Вопросы питания. - 2014.- Т.83, № 2.- С.42-49.
18. Здольник Т.Д. Токсиколого-гигиенические аспекты влияния металлов на функцию пищеварения // Рязань: Ряз. Гос. Ун-т им. С.А. Есенина. – 2007. – 172 с.
19. Измеров Н.Ф., Ермоленко А.Е., Тарасова Л.А. и др. Свинец и здоровье // Гигиенический и медико-биологический мониторинг. – Москва. – 2000. – 256 С.
20. Колпакова А. Ф. Роль загрязнения тяжелыми металлами среды обитания в патогенезе хронических заболеваний легких на Севере // Медицина труда и промышленная экология. 2004. - № 8. - С. 14 -19.
21. Конотопчик Е.Е. Тяжелые металлы в пищевой продукции, реализуемой на территории Хабаровского края// Ученые заметки ТОГУ. – 2013.- Т.4, № 2.- С. 50 – 56.
22. Королев А.А. Гигиена питания: учебник для студентов высших учебных заведений, 3-е издание, переработанное // Издательский центр «Академия». – 2008. – 528 с.
23. Кузубова Л.И., Шуваева О.В., Аношин Г.Н. Элементы-экотоксиканты в пищевых продуктах. Гигиенические характеристики, нормативы содержания в пищевых продуктах, методы определения: аналитический обзор // Новосибирск, серия «Экология». – Вып. 58. –2000. — 67 с.
24. Ливанов Г.А., Соболев М.Б., Ревич Б.А. Свинцовая опасность и здоровье населения. / Российский семейный врач. - 1999. - №2. - С.18-25.
25. Любченко П.Н. Абдоминальные нарушения при свинцовой интоксикации // Советская медицина. — 1983. — № 5. — С. 79—83.
26. Любченко П.Н. Интоксикационные заболевания органов пищеварения. — Воронеж, 1990. — 182 с.
27. Мотыляев А. Кадмий: факты и фактики // Химия и жизнь. – 2013. – №9. – с. 32-34.

28. МУК 4.1.1483-03 «Методы контроля. Химические факторы. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной аргоновой плазмой».
29. Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В., Бокитько Б.Г., Гинцбург А.Л., Гмошинский И.В. и др (всего 17 авторов) / Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов // Гигиена и Санитария.- 2007.- № 6.- С.3-10
30. Онищенко Г.Г., Тутельян В.А. О концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов// Вопросы питания. - 2007.-Т.76, № 6.- С.4-8.
31. Онищенко Г.Г., Тутельян В.А., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Развитие системы оценки безопасности и контроля наноматериалов и нанотехнологий в Российской Федерации// Гигиена и санитария. - 2013.- N 1.- С.4-11
32. Онищенко Г.Е., Ерохина М.В., Абрамчук С.С. и др. Влияние наночастиц диоксида титана на состояние слизистой оболочки тонкой кишки крыс//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012.- Т.154, № 8.-С.231-237.
33. Пиотровский Л.Б., Киселёв О.И. Фуллерены в биологии // СПб: ООО Издательство «Росток». - 2006.- 336с.
34. Пруденко О.В., Колесникова Т.В., Ефремова Г.М. Загрязнение свинцом воздуха и почвы большого города // Свинец в окружающей среде (Гигиен. аспекты) : сб. тр. — М., 1978. — С. 5—7.
35. Распопов Р.В., Верников В.М., Шумакова А.А. и др. Токсиколого-гигиеническая характеристика наночастиц диоксида титана, вводимых в виде дисперсии в желудочно-кишечный тракт крыс. Сообщение 1. Интегральные, биохимические и гематологические показатели, степень всасывания макромолекул в тонкой кишке, повреждение ДНК // Вопросы питания. – 2010. – Т.79, №4. – С.21-30
36. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека // Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир.- 2004.- 216 с., ил.
37. Снакин В.В. Загрязнение биосферы свинцом: масштабы и перспективы для России // Медицина труда и промышленная экология. — 1999. — № 5. — С. 21—26.
38. Тананова О.Н., Арианова Е.А., Гмошинский И.В. и др. Влияние наночастиц диоксида титана на белковый профиль микросом печени крыс// Вопросы питания. -2012. -Т.81, № 2. - С.24-28.
39. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / Под редакцией Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. – М.:ГЭОТАР –Медиа. – 2010. – 752 с., ил.

40. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие / Под редакцией проф. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2008. – 1016 с., ил.
41. Токсикологическая химия: Учебник для вузов / Под редакцией Т.В. Плетеневой. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2005. – 512 с., ил.
42. ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»
43. Тутельян В.А., Зайцева Н.В., Хотимченко С.А. и др. Сравнительная токсикологическая характеристика некоторых наноматериалов, содержащихся в пищевой продукции // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием в 2-х томах. Под редакцией А.Ю. Поповой, Н.В. Зайцевой. – 2016.- С.151-156.
44. Тутельян В.А., Хотимченко С.А., Гмошинский И.В. и др. Комплексная медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: информационно-аналитическая и экспериментальная составляющие// Здоровье населения и среда обитания (ЗНиСО).-2011, № 5(218).- С.15-18
45. Шевелева С.А., Кузнецова Г.Г., Батищева С.Ю. и др. Токсиколого-гигиеническая характеристика НЧ диоксида титана, вводимых в желудочно-кишечный тракт крыс. Сообщение 2. Состояние микробиоценоза толстой кишки, продукция цитокинов, аллергическая чувствительность// Вопросы питания. - 2010.- Т.79, № 5.- С.29-34.
46. Шипелин В.А., Трушина Э.Н., Авреньева Л.И. и др. Токсиколого-гигиеническая характеристика фуллеренола (гидроксилированного фуллерена C60) в 28-дневном эксперименте *in vivo*// Российские нанотехнологии. - 2013.- Т.8, № 11-12.- С.48-57.
47. Шумакова А.А., Авреньева Л.И., Гусева Г.В. и др. Токсикологическая оценка наноструктурного диоксида кремния II. Энзимологические, биохимические показатели, состояние системы антиоксидантной защиты//Вопросы питания. - 2014.- Т.83, № 4.- С.58-66.
48. Шумакова А.А., Арианова Е.А., Шипелин В.А. и др. Токсикологическая оценка наноструктурного диоксида кремния. I. Интегральные показатели, аддукты ДНК, уровень тиоловых соединений и апоптоз клеток печени// Вопросы питания. - 2014.- Т.83, № 3.- С.52-62.
49. Шумакова А.А., Ефимочкина Н.Р., Минаева Л.П. и др. Токсикологическая оценка наноструктурного диоксида кремния. III. Микрoэкологические, гематологические показатели, состояние системы иммунитета// Вопросы питания. - 2015.- Т.84, № 4.- С.46-56.
50. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К. и др. Влияние наночастиц диоксида титана и диоксида кремния на накопление и токсичность свинца в эксперименте при их внутрижелудочном введении // Вопросы питания. – М. – 2014. – Т.83, № 2. –С.57-63.

51. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К. и др. Токсичность свинца при его совместном введении с наноструктурным диоксидом кремния // Вопросы питания. – 2015. – Т.84, №2. – С.10-18.
52. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К. и др. Токсичность свинца при его совместном введении с наночастицами оксида алюминия крысам // Вопросы питания. – 2015. – Т.84, №3. – С.40-49.
53. Шумакова А.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К. и др. 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.
54. Шумакова А.А., Шипелин В.А., Трушина Э.Н. и др. Токсикологическая оценка наноструктурного диоксида кремния. IV. Иммунологические и аллергологические показатели у животных, сенсibilизированных пищевым аллергеном, и заключительное обсуждение// Вопросы питания. - 2015.- Т.84, № 5.-С.102-111.
55. Яблокова И.С., Стародумов В.Л. Содержание свинца в рационе детей 6-7 лет и возможность его коррекции// Вестн. Ивановской мед. академии.- 2012.- № 4.- С.7-11
56. Afridi H.I., Talpur F.N., Kazi T.G., Brabazon D. Effect of Trace and Toxic Elements of Different Brands of Cigarettes on the Essential Elemental Status of Irish Referent and Diabetic Mellitus Consumers // Biol Trace Elem Res. – 2015. – [Epub ahead of print].
57. Ahn M.H., Kang C.-M., Park C.-S., et al. Titanium dioxide particle – induced goblet cell hyperplasia : association with mast cells and IL-13 // Respiratory Res. - 2005. - Vol.6, N.1 - P.34.
58. Alcaraz-Contreras Y., Mendoza-Lozano R.P., Martínez-Alcaraz E.R., Martínez-Alfaro M., Gallegos-Corona M.A., Ramírez-Morales M.A., Vázquez-Guevara M.A. Silymarin and dimercaptosuccinic acid ameliorate lead-induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats // Hum Exp Toxicol. – 2015. – Epub ahead of print
59. Alghazal M.A., Sutiaková I., Kovalkovicová N., Legáth J., Falis M., Pistl J., Sabo R., Benová K., Sabová L., Váczi P. Induction of micronuclei in rat bone marrow after chronic exposure to lead acetate trihydrate // Toxicol Ind Health. – 2008. – 24(9). – P.587-593.
60. Al-Otaibi W.R., Virk P., Elobeid M. Ameliorative potential of stem bromelain on lead-induced toxicity in Wistar rats // Acta Biol Hung. – 2015. – V. 66(2)/ – P. 149-160.
61. Arts J.H., Muijser H., Duistermaat E., Junker K., Kuper C.F. Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months // Food Chem Toxicol. – 2007. –V.45, N.10. – P.1856-1867.

62. Ashwood P., Thompson R. P. H., Powell J. J. Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells // *Exp. Biol. Med.* - 2007. - Vol.232 - P.107–117.
63. Balasubramanyam A., Sailaja N., Mahboob M., et.al. *In vitro* mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the Salmonella/microsome assay//*Toxicol. In vitro.*- 2010.- Vol. 24, N 6.- P.1871-1876.
64. Bang S.H., Le T.-H., Lee S.K. et al. Toxicity Assessment of Titanium (IV) Oxide Nanoparticles Using *Daphnia magna* (Water Flea)// *Environ. Health Toxicol.*- 2011.- Vol.26.- P.e2011002.
65. Bannon D.I., Abounader R., Lees P.S., Bressler J.P. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells// *Am. J. Physiol Cell Physiol.*- 2003.- Vol.284, № 1.- P.C44-C50
66. Barton I.C., Huster W.I. Seasonal changes in lead absorption in laboratory rats // *Environm. Hlth. Perspect.* — 1987. — V. 73 (August). — P. 209—214.
67. Benetti F., Bregoli L., Olivato I., Sabbioni E. Effects of metal(loid)-based nanomaterials on essential element homeostasis: the central role of nanometallomics for nanotoxicology // *Metallomics.* 2014. V. 6. № 4. P. 729 – 747.
68. Benford D.J., Thatcher N., Mason D. et al. Aluminium from all sources, including food additives and contaminants (addendum). First draft//*Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food additives.*- 2007.- Series 58.-p. 119-209.
69. Bennat C., Müller-Goymann C.C. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter // *Int. J. Cosmet. Sci.* - 2000. - Vol.22, N.4. - P.271-283.
70. Bishak Y.K., Payahoo L., Osatdrahimi A., Nourazarian A. Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2015. – V.16. N.1. – P.9-21.
71. Bocca B., Caimi S., Senofonte O., Alimonti A., Petrucci F. ICP-MS based methods to characterize nanoparticles of TiO₂ and ZnO in sunscreens with focus on regulatory and safety issues // *Sci Total Environ.* – 2018. – V. 630. – P. 922-930. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.166.
72. Bondy S.C. Nanoparticles and Colloids as Contributing Factors in Neurodegenerative Disease// *Int. J. Environ. Res. Public. Health.*- 2011.- Vol.8, N 6.- P.2200–2211.
73. Borbala D., Gabor K., McAleer F.M., et al. *In vivo* radioprotection by the fullerene nanoparticle DF-1as assessed in a Zebrafish model // *Clin. Cancer Res.* - 2006. - Vol.12, N.23.
74. Braydich-Stolle L.K., Speshock J.L., Castle A., et.al. Nanosized aluminum altered immune function// *ACS Nano.*- 2010.- Vol.4, N 7.- P.3661-3670.

75. Bu Q., Yan G., Deng P. et al. NMR-based metabonomic study of the sub-acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after oral administration. // *Nanotechnology*. - 2010. - Vol.21, N.12. - P.125105.
76. Bulter C.A., Timperley M.H. Fertilised farmland as a source of cadmium in oysters // *Science of The Total Environment*. – 1996. – V. 181, Iss. 1. – p. 31-44.
77. Burklew C.E., Ashlock J., Winfrey W.B., Zhang B. Effects of Aluminum Oxide Nanoparticles on the Growth, Development, and microRNA Expression of Tobacco (*Nicotiana tabacum*)// *PLoS One*.- 2012.- Vol.7, N 5.- P.e34783.
78. Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics // 4 ed. Ed. Elsevier. – New Delhi. –2006. – 2412 p.
79. Butz T. Percutaneous uptake of nanoparticles: the NANODERM project // *Book of Abstracts of EuroNanoForum*. – 2005. - 93p.
80. Calao C.R., Marrugo J.L. Genotoxic effects in a human population exposed to heavy metals in the region of La Mojana, Colombia, 2013 // *Biomedica*. – 2015. – V.35. – P.139-151.
81. Chen C., Xing G., Wang J., et al. Multihydroxylated [Gd@C82(OH)22]n nanoparticles: antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity // *Nano. Lett.* - 2005. - Vol.5, N.10. - P.2050-2057.
82. Chen E.Y., Garnica M., Wang Y.-C. et al. A mixture of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles induces histamine secretion in mast cells// *Part- Fibre Toxicol.*- 2012.- Vol.9.-2 P.
83. Chen H.W., Su S.F., Chien C.T., et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice // *FASEB J.* - 2006. - Vol.20. - P.1732–1741.
84. Chen J., Dong X., Zhao J., Tang G. *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection// *J. Appl. Toxicol.*- 2009.- Vol.29, N 4.- P.330-337.
85. Choi S.J., Oh J.M., Park T., Choy J.H. Cellular toxicity of inorganic hydroxide nanoparticles // *Nanosci. Nanotechnol.* - 2007. - Vol.7, N.11. - P.4017-4020.
86. Ciarrocca M., Capozzella A., Tomei F., Tomei G., Caciari T. Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone // *Chemosphere*. – 2013. –V.90 (7). – p. 2077–2084.
87. Coleman J.G., Johnson D.R., Stanley J.K., et.al. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*// *Environ. Toxicol. Chem.*- 2010.- Vol.29, N 7.- P.1575-1580.
88. Corbalan J.J., Medina C., Jacoby A., Malinski T., Radomski M.W. Amorphous silica nanoparticles aggregate human platelets: potential implications for vascular homeostasis // *Int. J. Nanomedicine*.–2012. –Vol.7.– P. 631–639.

89. Corinaldesi C., Marcellini F., Nepote E., Damiani E., Danovaro R. Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora* spp.) // *Sci Total Environ.* – 2018. – V. 637-638. – P. 1279-1285. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.108.
90. Cramer K. Predisposing factors for lead poisoning // *Acta Med. Scand.* — 1966. — V. 179. — P. 55—59.
91. Cronholm P., Karlsson H.L., Hedberg J. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions // *Small.* – 2013. – Vol. 9(7). – P.970-982
92. Cucchiella F., D’Adamo I. Estimation of the energetic and environmental impacts of a roof-mounted building-integrated photovoltaic systems // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – V. 16, Iss. 7. – 2012. – p. 5245–5259.
93. Cui F., He C., Yin L. et al. Nanoparticles incorporated in bilaminated films: a smart drug delivery system for oral formulations// *Biomacromolecules.*-2007.-Vol. 8, № 9.- P. 2845-2850
94. Davis J.R., Andelman S.L. Urinary Delta-Aminoolevulinic Acid (ALA) Levels in Lead Poisoning // *Arch Environ Health.* – V. 15. – 1967. – p. 53-59.
95. del C Díaz M., González N.V., Gómez S., Quiroga M.A., Najle R., Barbeito C.G. Effect of a single dose of cadmium on pregnant Wistar rats and their offspring // *Reprod Domest Anim.* – 2014. – V.49, N.6. – P.1049-1056.
96. Demont M., Boutakhrit K., Fekete V., Bolle F., Van Loco J. Migration of 18 trace elements from ceramic food contact material: influence of pigment, pH, nature of acid and temperature // *Food Chem Toxicol.* – 2012. – V.50 (3-4). – p.734-743
97. Deng R., Lin D., Zhu L et al. Nanoparticle interactions with co-existing contaminants: joint toxicity, bioaccumulation and risk // *Nanotoxicology* – 2017.- V.11 (5).- P. 591-612. doi: 10.1080/17435390.2017.1343404.
98. Diamond G.L., Goodrum P.E., Felter S.P., Ruoff W.L. Gastrointestinal absorption of metals // *Chem. Toxicol.* — 1997. — V. 20, N 4. — P. 345—368.
99. Dietrich K.N., Succop P.A., Berger O.G., Keith R.W. Lead exposure and the central auditory processing abilities and cognitive development of urban children: The Cincinnati lead study cohort at age 5 years. // *Neurotoxicology and Teratology.* - 1992. – Vol. 14, Issue 1 – P. 51-56.
100. Di Virgilio A.L., Reigosa M., Arnal P.M., Fernández Lorenzo de Mele M.J. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells// *Hazard Mater.*- 2010.- Vol.177, N 1-3.- P.711-718.
101. Di Virgilio A.L., Reigosa M., de Mele M.F. Response of UMR 106 cells exposed to titanium oxide and aluminum oxide nanoparticles// *J. Biomed. Mater. Res. A.*- 2010.- Vol.92, N 1.- P.80-86.

102. Dong E., Wang Y., Yang S.T.et.al. Toxicity of nano gamma alumina to neural stem cells// J.Nanosci.Nanotechnol.-2011.- Vol.11, N 9.- P.7848-7856.
103. Doyle J.J., Pfander W.H. Interactions of cadmium with copper, iron, zinc, and manganese in ovine tissues// J Nutr. 1975 May;105(5):599-606.
104. Downs T.R., Crosby M.E., Hu T., Kumar S., Sullivan A., Sarlo K., Reeder B., Lynch M., Wagner M., Mills T., Pfuhrer S. Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not // Mutat Res. – 2012. – V.745., N.1-2. – P.35-50.
105. Duan Y., Liu J., Ma L. et al. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. // Biomaterials. - 2010. - Vol.31, N.5. - P.894-899.
106. Ehle, A.L.; McKee, D.C. Neuropsychological effect of lead in occupationally exposed workers: a critical review. // Crit. Rev. Toxicol. - 1990. – Vol. 20. – P. 237-255.
107. El-Shabouri M.H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A// Int. J. Pharm. - 2002.- Vol.249, № 1-2.- P.101-108
108. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles / Zhang X., Sun H., Zhang Z., Niu Q., Chen Y., Crittenden J.C. // Chemosphere. – 2007. – 67 (1). – P. 160-166.
109. Eom H.J., Choi J. SiO₂ nanoparticles induced cytotoxicity by oxidative stress in human bronchial epithelial cell, Beas-2B // Environ. Health Toxicol.–2011.– Vol. 26.– P.e2011013.
110. Eom H.-J., Choi J. Nanoparticles induced cytotoxicity by oxidative stress in human bronchial epithelial cell, Beas-2B // Environ. Health Toxicol.– 2011.– Vol. 26.– P.e2011013.
111. Esch R.K., Han L., Foarde K.K., Ensor D.S. Endotoxin contamination of engineered nanomaterials// Nanotoxicology.- 2010.-Vol. 4, № 1.- P. 73-83.
112. Evaluation of certain food additives and contaminants (53rd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 896. – 2000 – 136 p.
113. Evaluation of certain food additives and contaminants (73rd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 960 – 2011. – 237 p.
114. Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats // Arch. Toxicol. - 2008. - Vol.82, N.3. - P.151-157.
115. Fang J., Lyon D.Y., Wiesner M.R., et al. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior // Environ Sci. Technol. - 2007. - Vol.41, N.7. - P.2636-2642.

116. Fenoglio I., Greco G., Livraghi S., Fubini B. Non-UV-induced radical reactions at the surface of TiO₂ nanoparticles that may trigger toxic responses// Chemistry.- 2009.- Vol.15, N 18.- P.4614-4621.
117. Fröhlich E., Roblegg E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products// Toxicology.- 2012.- Vol. 291, N 1-3.- P.10–17.
118. Galloway T., Lewis C., Dolciotti I. et al. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. // Environ Pollut. - 2010. - Vol.158, N.5. - P.1748-1755.
119. García-Lestón J., Méndez J., Pásaro E., Laffon B. Genotoxic effects of lead: an updated review // Environ Int. – 2010. – V. 36(6). – P. 623-636.
120. Gautam P., Flora S.J. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats // Nutrition. – 2010. – V. 26 (5). – P. 563-570.
121. Ge Y., Chen L., Sun X., Yin Z., Song X., Li C., Liu J., An Z., Yang X., Ning H. Lead-induced changes of cytoskeletal protein is involved in the pathological basis in mice brain // Environ Sci Pollut Res Int. – 2018. – V. 25. – №12. – P. 11746-11753. Doi: 10.1007/s11356-018-1334-6.
122. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., et al. [60] Fullerene is an *in vivo* powerful antioxidant with no acute or sub-acute toxicity // Nano Letters. - 2005. - Vol.5. - P.2578-2585.
123. Ghoshal K., Jacob S.T. Regulation of metallothionein gene expression// Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.- 2001.- Vol.66.- P.357-384
124. Gonçalves D.M., Chiasson S., Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. // Toxicol. *In vitro*. - 2010. - Vol.24, N.3. - P.1002-1008.
125. Goswami P., Hariharan G., Godhantaraman N., Munuswamy N. An integrated use of multiple biomarkers to investigate the individual and combined effect of copper and cadmium on the marine green mussel (*Perna viridis*) // J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. – 2014. – V.49, N.13. – P. 1564-1577.
126. Goyer R.A. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C., ed., Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, New York, 1996: McGraw-Hill, P. 691-737.
127. Gramowski A., Flossdorf J., Bhattacharya K. et al. Nanoparticles induce changes of the electrical activity of neuronal networks on microelectrode array neurochips. // Environ. Health. Perspect. - 2010.– Vol.118, N 10.- P.1363-1369.
128. Grassian V.H., O'shaughnessy P.T., Adamcakova-Dodd A., et al. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm // Environ. Health Perspect. - 2007. - Vol.115, N.3. - P.397-402.

129. Gregus Z., Klaassen C.D. Disposition of metals in rats: A comparative study of fecal, urinary and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals // *Toxicol. appl. Pharmacol.* — 1986. — V. 85, N 1. — P. 24—38.
130. Guichard Y., Fontana C., Chavinier E., Terzetti F., Gaté L., Binet S., Darne C. Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line // *Toxicol Ind Health.* – 2015. – Epub ahead of print
131. Guichard Y., Maire M.A., Sébillaud S., Fontana C., Langlais C., Micillino J.C., Darne C., Roszak J., Stępnik M., Fessard V., Binet S., Gaté L. Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 2: intratracheal instillation and intravenous injection // *Environ Mol Mutagen.* – 2015. – V.56, N.2. – P.228-244.
132. Gustafsson Å., Lindstedt E., Svensson Elfsmark L., Bucht A. Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat//*J. Immunotoxicol.*- 2011.- Vol.8, N 2.- P.111–121.
133. Hackenberg S., Friehs G., Froelich K. et al. Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. // *Toxicol. Lett.* - 2010. - Vol.195, N.1. - P.9-14.
134. Han B., Guo J., Abrahaley T. et al. Adverse Effect of Nano-Silicon Dioxide on Lung Function of Rats with or without Ovalbumin Immunization//*PLoS One.*- 2011.- Vol.6, N 2.- P.e17236
135. Hartmann N.B., Von der Kammer F., Hofmann T., et al. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability// *Toxicology.*- 2010.- Vol.269, N 2-3.- P.190-197.
136. Heinrich R.F., Driscoll K.E., Harkema J.R. et al. A comparison of the inflammatory response of the lung to inhaled versus instilled particles in F344 rats // *Fund. Appl. Toxicol.* - 1995. – Vol.24. – P.183–197.
137. Hu J., Zhang Z., Zhang C. et al. Al₂O₃ nanoparticle impact on the toxic effect of Pb on the marine microalga *Isochrysis galbana* // *Ecotoxicol Environ Saf.*- 2018.- V. 161.- P. 92-98. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.090
138. Hussain S., Thomassen L.C., Ferecatu I. et al. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. // *Part. Fibre Toxicol.* - 2010. - Vol.7. - P.10.
139. Ichihara N., Matsushiro N. Biliary and urinary excretion of metals in humans // *Arch. environm. Hlth.* — 1986. — V. 41, N 5. — P. 324—330.
140. Inorganic and Organic Lead Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. – 2006. – Volume 87. – P. 519.

141. International Agency for Research on Cancer .IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Carbon black, titanium dioxide and nonasbestiform talc.-2007. - Vol.93. -<http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/index1.php>.
142. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils.- Lyon: IARC. - 1997. Vol.68.- 506 p.
143. International standards for drinking water. WHO, 3rd ed. – Geneva. – 1971. – 70 p.
144. Isakovic A., Markovic Z., Todorovic-Markovic B., et al. Distinct cyto-toxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene // *Toxicol. Sci.* - 2006. - Vol.91, N.1. - P.173-183
145. Jenny-Burri J., Haldimann M., Brüsweiler B.J., Bochud M., Burnier M., Paccaud F., Dudler V. Cadmium body burden of the Swiss population // *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* – 2015. – [Epub ahead of print].
146. Jiang W., Mashayekhi H., Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles// *Environ. Pollut.*- 2009.- Vol.157, N 5.- P.1619-1625.
147. Jin C., Tang Y., Yang F.G. et al. Cellular toxicity of TiO(2) nanoparticles in anatase and rutile crystal phase.// *Biol. Trace Elem. Res.* – 2011.- Vol.141, N 1-3.- P.3-15.
148. Jindal R., Verma S. *In vivo* genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton) // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2015. – V.118. – P.1-10.
149. Kamunde C., MacPhail R. Metal-metal interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*// *Ecotoxicol. Environ. Saf.*- 2011 .- Vol.74, № 4.-P. 658-667.
150. Kasper J., Hermanns M.I., Bantz C., Maskos M., Stauber R., Pohl C., Unger R.E., Kirkpatrick J.C. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: Comparison with conventional monocultures // *Part. Fibre Toxicol.*– 2011. – Vol.8.– P. 1– 6.
151. Kim I.S., Baek M., Choi S.J. Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells// *J. Nanosci. Nanotechnol.*- 2010.- Vol.10, N 5.- P.3453-3458.
152. Kim K.T., Klaine S.J., Cho J., Kim S.H., Kim S.D. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO(2) nanoparticles according to size fraction. // *Sci Total Environ.* - 2010. - Vol.408, N.10. - P.2268-2272.
153. Klein C.L., Wiench K., Wiemann M., Ma-Hock L., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. Hazard identification of inhaled nanomaterials: making use of short-term inhalation studies // *Arch Toxicol.* – 2012. – V.86, N.7. – P.1137-1151.

154. Kobayashi N., Naya M., Endoh S., et al. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results// *Toxicology*.- 2009.- Vol.264, N 1-2.- P.110-118.
155. Koeneman B.A., Zhang Y., Westerhoff P. et al. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. // *Cell. Biol. Toxicol.* - 2010. - Vol.26, N.3. - P.225-238.
156. Koponen I.K., Jensen K.A., Schneiderb T. Comparison of dust released from sanding conventional and nanoparticle-doped wall and wood coatings// *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*- 2011.- Vol.21, N 4.- P.408–418.
157. Krewski D.,Yokel R.A., Nieboer E., Borchelt D., Cohen J., Harry J., Kacew S., Lindsay J., Mahfouz A.M., Rondeau V. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide//*J. Toxicol. Environ Health B Crit. Rev.*- 2007.- Vol. 10, Suppl 1.- P. 1–269.
158. Lai X., Blazer-Yost B.L., Clack J.W., Fears S.L., Mitra S., Ntim S.A., et al. Protein expression profiles of intestinal epithelial co-cultures: effect of functionalised carbon nanotube exposure. *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* 2013; 3(1-2): 10
159. Larsen S.T., Roursgaard M., Jensen K.A., Nielsen G.D. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* - 2010. - Vol.106, N.2. - P.114-117.
160. LeBlanc A.J., Moseley A.M., Chen B.T. et al. Nanoparticle inhalation impairs coronary microvascular reactivity via a local reactive oxygen species-dependent mechanism. // *Cardiovasc. Toxicol.* - 2010. - Vol.10, N.1. - P.27-36.
161. Leiba A., Hu H., Zheng A., Kales S.N. A safe strategy to decrease fetal lead exposure in a woman with chronic intoxication // *J Matern Fetal Neonatal Med.* – 2010. – V. 23 (8). – P. 932-934.
162. Li L., Liu T., Fu C., Tan L., Meng X., Liu H. Biodistribution, excretion, and toxicity of mesoporous silica nanoparticles after oral administration depend on their shape // *Nanomedicine.* – 2015. –Vol. 11, N.8. – P.1915-1924.
163. Li M., Czymmek K.J., Huang C.P. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles: a dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution// *J. Hazard. Mater.*- 2011.- Vol.187. N 1-3.- P.502-508.
164. Li N., Duan Y., Hong M. et al. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticules. // *Toxicol Lett.* - 2010. - Vol.195, N.2-3. - P.161-168.
165. Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles // *Free Radic. Biol. Med.* - 2008. - Vol.44, N.9. - P.1689-1699.

166. Liang G., Pu Y., Yin L., et al. Influence of different sizes of titanium dioxide nanoparticles on hepatic and renal functions in rats with correlation to oxidative stress// *J. Toxicol. Environ. Health A.*- 2009.- Vol.72, N 11.- P.740-745.
167. Liao C.M., Chiang Y.H. Chio C.P. Assessing the airborne titanium dioxide nanoparticle-related exposure hazard at workplace// *J. Hazard. Mater.*- 2009.- Vol. 162, N 1.- P.57-65.
168. Lin A.M., Chyi B.Y., Wang S.D., et al. Carboxyfullerene prevents iron-induced oxidative stress in rat brain // *J. Neurochem.* - 1999. - Vol.72, N.4. - P.1634-1640.
169. Lin Y.S., Haynes C.L. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity // *J. Am. Chem. Soc.*- 2010.- Vol. 132, № 13.- P. 4834-4842.
170. Ling X.Y., Zhu L., Wei W.J., Feng J.F. Acute pulmonary toxicity of rats caused by different sized SiO₂ nanoparticles // *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* – 2010. – V.28, N.7. – P. 508-511.
171. Limbach L.K., Wick P., Manser P., et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress // *Environ. Sci. Technol.* - 2007. - V.41, N.11. - P.4158-4163.
172. Liu H., Ma L., Zhao J., et al. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice// *Biol. Trace Elem. Res.*- 2009.-Vol.129, N 1-3.- P.170-180.
173. Liu N., Wang Y., Ge F. et al. Antagonistic effect of nano-ZnO and cetyltrimethyl ammonium chloride on the growth of *Chlorella vulgaris*: Dissolution and accumulation of nano-ZnO // *Chemosphere.* – 2018. – V. 196. – P. 566-574. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.184.
174. Liu S., Xu L., Zhang T., Ren G., Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. // *Toxicology.* - 2010. - Vol.267, N.1-3. - P.172-177.
175. Liu Y., Jiao F., Qiu Y., et al. The effect of Gd@C82(OH)₂₂ nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity// *Biomaterials.*- 2009.- Vol.30, N 23-24.- P.3934-3945.
176. Lu H., Yuan G., Yin Z., Dai S., Jia R., Xu J., Song X., Li L., Lv C. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2014. – V.7, N.2. – P.640-647.
177. Ma-Hock L., Burkhardt S., Strauss V., et al. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance// *Inhal. Toxicol.*- 2009.- Vol.21, N 2.- P.102-118.
178. Margalioth E.J., Schenker J.G., Chevion M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues// *Cancer.* - 1983. - Vol.52, № 5.- P.868-872

179. Maser E., Schulz M., Sauer U.G., Wiemann M., Ma-Hock L., Wohlleben W., Hartwig A., Landsiedel R. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* – 2015. – V. 794. – P.57-74.
180. Mauzerall D., Granick S. The occurrence and determination of aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine // *J. Biol. Chem.* – V. 219. – 1956. – p. 435-446.
181. McLeish J.A., Chico T.J., Taylor H.B., et al. Skin exposure to micro- and nano-particles can cause haemostasis in zebrafish larvae// *Thromb. Haemost.*- 2010.- Vol.103, N 4.- P.797-807.
182. Migdal C., Rahal R., Rubod A. et al. Internalisation of hybrid titanium dioxide/para-amino benzoic acid nanoparticles in human dendritic cells did not induce toxicity and changes in their functions. // *Toxicol. Lett.* - 2010. – Vol.199, N 1.- P.34-42.
183. Migliore L., Uboldi C., Di Bucchianico S., Coppedè F. Nanomaterials and neurodegeneration // *Environ Mol Mutagen.* – 2015. – V. 56, N.2. – P. 149-170.
184. Mikkelsen L., Sheykhzade M., Jensen K.A. et al. Modest effect on plaque progression and vasodilatory function in atherosclerosis-prone mice exposed to nanosized TiO₂// *Part. Fibre Toxicol.*- 2011.- Vol.8.- 32 P.
185. Miller R.J., Bennett S., Keller A.A. et al. TiO₂ Nanoparticles Are Phototoxic to Marine Phytoplankton// *PLoS One.*- 2012.- Vol. 7, N 1.- P. e30321.
186. Monteiller C., Tran L., MacNee W., et al. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells *in vitro*: the role of surface area // *Occup. Environ. Med.* - 2007. - Vol.64, N.9. - P.609-615.
187. Moon C., Park H.J., Choi Y.H. et al. Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO₂) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide. // *J. Toxicol. Environ. Health A.* - 2010. - Vol.73, N.5. - P.396-409.
188. Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A. et al. Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2010. - Vol.392, N.2. - P.160-165.
189. Mrđanović J., Solajić S., Bogdanović V., et al. Effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells// *Mutat. Res.*- 2009.- Vol.680, N 1-2.- P.25-30.
190. Musee N., Oberholster P.J., Sikhwivhilu L., Botha A.M. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805) // *Chemosphere.*- 2010.- Vol.81, N 10.- P.1196-1203.

191. Muthusamy S., Peng C., Ng J.C. Genotoxicity evaluation of multi-component mixtures of polyaromatic hydrocarbons (PAHs), arsenic, cadmium, and lead using flow cytometry based micronucleus test in HepG2 cells // *Mutat Res.* – 2018. – V. 827. – P. 9-18. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.01.002.
192. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes // *Part. Fibre Toxicol.*– 2011.– Vol. 8, № 1. – P. 1-10.
193. Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K., Tanaka N. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles // *Mutat. Res.* – 1997. – Vol.394. – P.125-132.
194. Napierska D., Thomassen L.C., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Martens J.A., Hoet P.H. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells// *Small.*– 2009.– Vol. 5, № 7.– P. 846-853.
195. Neala A.P., Guilarte T.R. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity// *Toxicol. Res. (Camb).*- 2013 .- Vol. 2, № 2.- P. 99–114.
196. Newman N., Jones C., Page E., Ceballos D., Oza A. Investigation of Childhood Lead Poisoning from Parental Take-Home Exposure from an Electronic Scrap Recycling Facility - Ohio, 2012 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2015. – V.64, No.27. – P.743-745.
197. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. Silica nanoparticles as hepatotoxicants // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2009. – V.72, N.3. – P.496-501.
198. Nohynek G.J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M.S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety // *Crit. Rev. Toxicol.* - 2007. - Vol.37, N.3. - P.251-277.
199. Novak S., Drobne D., Menard A. Prolonged feeding of terrestrial isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea) on TiO₂ nanoparticles. Absence of toxic effect// *Zookeys.*- 2012.- Vol.176.- P.261–273.
200. Nurkiewicz T.R., Porter D.W., Hubbs A.F., et al. Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling// *Toxicol. Sci.*- 2009.- Vol.110, N 1.- P. 191-203.
201. Oberdorster G. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // *Environmental Health Perspective.* – 2005. – Vol. 7. – P. 823–839. Maynard A.D. Nanotechnology: assessing the risks // *Nano today.* – 2006. – V.1, N.2. – P.22-33.
202. O'Brien N., Cummins E. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. // *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* - 2010. - Vol.45, N.8. - P.992-1007.

203. Ogawa Y.; Hirata M.; Okayama A.; Ichikawa Y.E.; Coto S. Latency of the Achilles tendon reflex for detection of reduced function of the peripheral nervous system in workers exposed to lead. // *Br. J. Ind. Med.* – 1993. Vol. 50. – P. 229-233.
204. Oliveira H., Monteiro C., Pinho F., Pinho S., Ferreira de Oliveira J.M., Santos C. Cadmium-induced genotoxicity in human osteoblast-like cells // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* – 2014. – V.775-776. – P. 38-47.
205. Omeljaniuk W.J., Socha K., Soroczynska J., Charkiewicz A.E., Laudanski T., Kulikowski M., Kobylec E., Borawska M.H. Cadmium and Lead in Women Who Miscarried // *Clin Lab.* – 2018. – V. 64. – №1. – P. 59-67. Doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170611
206. Pan X., Redding J.E., Wiley P.A. et al. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay// *Chemosphere.*- 2010.- Vol.79, N 1.- P.113-116.
207. Pan Z., Lee W., Slutsky L., et al. Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells// *Small.*- 2009.- Vol.5, N 4.- P.511-520.
208. Park E.J., Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles *in vivo* and *in vitro* // *Toxicol. Lett.* – 2009.– Vol.184, № 1.– P.18-25.
209. Park H.J., Sohn J.H., Kim Y.J., Park Y.H., Han H., Park K.H., Lee K., Choi H., Um K., Choi I.H., Park J.W., Lee J.H. Acute exposure to silica nanoparticles aggravate airway inflammation: different effects according to surface characteristics // *Exp Mol Med.* – 2015. – Vol. 47, e173.
210. Park E.J., Yoon J., Choi K., et al. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation// *Toxicology.*- 2009.- Vol.260, N 1-3.- P.37-46.
211. Park M.V., Annema W., Salvati A., Lesniak A., Elsaesser A., Barnes C., McKerr G., Howard C.V., Lynch I., Dawson K.A., Piersma A.H., de Jong W.H. *In vitro* developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*– 2009.– Vol.240, №1.– P. 108-116.
212. Patar A., Giri A., Boro F., Bhuyan K., Singha U., Giri S. Cadmium pollution and amphibians - Studies in tadpoles of *Rana limnocharis* // *Chemosphere.* – 2015. – V.144. – P. 1043-1049.
213. Pauluhn J. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size// *Toxicol Sci.*- 2009.- Vol.109, N 1.- P.152-167.
214. Pelgrom S.M.G.J., Lamers L.P.M., Lock R.A.C., Balm P.H.M., Wendelaar Bonga S.E. Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia, *Oreochromis mossambicus*//*Environ.Pollution.*- 1995.-Vol.90, № 3.- P. 415-423

215. Perez Aguilar R.C., Honoré S.M., Genta S.B., Sánchez S.S. Hepatic fibrogenesis and transforming growth factor/Smad signaling activation in rats chronically exposed to low doses of lead // *J Appl Toxicol.* – 2014. – V.34(12). – P. 1320-1331.
216. Pfefferkorn F.E., Bello D., Haddad G., Park J-Y. et al. Characterization of Exposures to Airborne Nanoscale Particles During Friction Stir Welding of Aluminum// *Ann. Occup. Hyg.*- 2010.- Vol.54, N 5.- P.486–503.
217. Rabinowitz M.R., Wetherill G.W., Kopple J.D. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans // *Journal of Clinical Investigation.* - 1976. – Vol. 58. – P. 260-270.
218. Rabinowitz, M.B. Lead metabolism in the normal human: stable isotope studies / M.B. Rabinowitz, G.W. Wetherill, I.D. Kopple // *Science.* – 1973. – V. 182. — P. 725—727.
219. Radziun E., Dudkiewicz-Wilczyńska J., Książek I., et al. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells//*Toxicol. In vitro.*- 2011.- Vol.25, N 8.- P.1694-700.
220. Raja P.M. Connolley J., Ganesan G.P., et al. Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells // *Toxicol. Lett.* - 2007. - Vol.169, N.1. - P.51-63.
221. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet // *J Nutr.* – 1993. – Vol.123, N.11. – P.1939–51.
222. Rehn B., Seiler F., Rehn S., et al. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated// *Toxicol.Appl.Pharmacol.* - 2003.- Vol.189, N.2. -P.84-95.
223. Renwick L.C., Brown D., Clouter A., Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types // *Occup. Environ. Med.* - 2004. - Vol.61. - P.442–447.
224. Roberts J.E., Wielgus A.R., Boyes W.K., et al. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2008. - Vol.228, N.1. - P.49-58.
225. Rossi E.M., Pylkkänen L., Koivisto A.J. Vippola M., Jensen K.A., Miettinen M., Sirola K., Nykäsenoja H., Karisola P., Stjernvall T., Vanhala E., Kiilunen M., Pasanen P., Mäkinen M., Hämeri H., Joutsensaari J., Tuomi T., Jokiniemi J., Wolff H., Savolainen K., Matikainen S., Alenius H. Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice // *Toxicol. Sci.*– 2010.– Vol.113, N.2.– P.422-433.
226. Roy A., Queirolo E., Peregalli F., Mañay N., Martínez G., Kordas K. Association of blood lead levels with urinary F₂-8 α isoprostane and 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine concentrations in first-grade Uruguayan children // *Environ Res.* – 2015. – V. 140. – P. 127-135.

227. Rushton E.K., Jiang J., Leonard S.S. et al. Concept of assessing nanoparticle hazards considering nanoparticle dose-metric and chemical/biological response metrics. // *J. Toxicol. Environ. Health A.* – 2010. – Vol.73, N.5. – P.445-461.
228. Saber A.T., Jacobsen N.R., Mortensen A. et al. Nanotitanium dioxide toxicity in mouse lung is reduced in sanding dust from paint// *Part. Fibre Toxicol.*- 2012.- Vol. 9.- 4 P.
229. Sadrieh N., Wokovich A.M., Gopee N.V. et al. Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles// *Toxicol. Sci.*- 2010 .- Vol.115, N 1.- P.156–166.
230. Safety evaluation of certain food contaminants. WHO Food series:64. Geneva. – 2011. – 551 p.
231. Sager T.M., Castranova V. Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: comparison to ultrafine titanium dioxide// *Part. Fibre Toxicol.*- 2009.- N 6.- P.1-15.
232. Sakai A., Yamakoshi Y.N., Miyata N. The effects of fullerenes on the initiation and promotion stages of BALB/3T3 cell transformation // *Full. Sci. Technol.* - 1995. – Vol.3. - P.377-388.
233. Sayes C.M., Reed K.L., Warheit D.B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles // *Toxicol. Sci.* - 2007. - Vol.97, N.1. - P.163-180.
234. Sayes C.M., Reed K.L., Glover K.P., Swain K.A., Ostraat M.L., Donner E.M., Warheit D.B. Changing the dose metric for inhalation toxicity studies: short-term study in rats with engineered aerosolized amorphous silica nanoparticles // *Inhal.Toxicol.*– 2010. – Vol.22, N.4. – P.348-354.
235. Schulz J., Hohenberg H., Pflücker F. et al. Distribution of sunscreens on skin // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2002. – Vol.54, Suppl.1. – P.157-163.
236. Scown T.M., van Aerle R., Johnston B.D., et al. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function// *Toxicol. Sci.*- 2009.- Vol.109, N 2.- P.372-380.
237. Sergeant J.A., Paget V., Chevillard S. Toxicity and genotoxicity of nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line // *Ann Occup Hyg.* – 2012. – V.56, N.5. – P.622-630.
238. Shin J.A., Lee E.J., Seo S.M. et al. Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse. // *Neuroscience.* - 2010. - Vol.165, N.2. - P.445-454.
239. Silicon dioxide, amorphous. Rome: JECFA. 1973-1992. 2 p. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-385.pdf>.
240. Silicon dioxide, amorphous. Rome: JECFA, Monographs 17 (2015). <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>.

241. Shi Y., Zhang J.H., Jiang M. et al. Synergistic genotoxicity caused by low concentration of titanium dioxide nanoparticles and p,p'-DDT in human hepatocytes. // *Environ. Mol. Mutagen.* - 2010. - Vol.51, N.3. - P.192-204.
242. Shumakova A.A., Gmshinski I.V., Khotimchenko S.A., Trushina E.N. 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.
243. Simões M.R., Aguado A., Fiorim J., Silveira E.A., Azevedo B.F., Toscano C.M., Zhenyukh O., Briones A.M., Alonso M.J., Vassallo D.V., Salaices M. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2015. – V.283(2). – P.127-138.
244. Scherbart A.M., Langer J., Bushmelev A. et al. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms// *Part. Fibre Toxicol.*- 2011.- Vol.8.-31 P.
245. Scott V. Adams, Polly A. Newcomb, Martin M. Shafer, Charlotte Atkinson, Erin J. Aiello Bowles, Katherine M. Newton, Johanna W. Lampe. Sources of cadmium exposure among healthy premenopausal women // *Science of The Total Environment.* – 2011. – V. 409, Iss. 9. – p. 1632-1637.
246. Stadler T., Buteler M., Weaver D.K. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide//*Pest. Manag. Sci.*- 2010.- Vol. 66, N 6.- P.577-579.
247. Stanley J.K., Coleman J.G., Weiss C.A. Jr, Steevens J.A. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide// *Environ. Toxicol. Chem.*- 2010.- Vol.29, N 2.- P.422-429.
248. Stollery B.T., Broadbent D.E., Banks H.A., Lee W.R. Short-term prospective study of cognitive functioning in lead workers. // *British Journal of Industrial Medicine* – 1991. – Vol. 48. – P. 739-749.
249. Sugibayashi K., Todo H., Kimura E. Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles // *Toxicol. Sci.* - 2008. - Vol.33, N.3. - P.293-298.
250. Sun H., Zhang X., Zhang Z., et al. Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite// *Environ. Pollut.*- 2009.- Vol.157, N 4.- P.1165-1170.
251. Zhang X., Sun H., Zhang Z., et al. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles//*Chemosphere.* - 2007.- Vol.67, N.1.- P.160-166.
252. Sun J., Wang S., Zhao D., et.al. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles// *Cell Biol. Toxicol.* - 2011.- Vol.27, N 5.- P.333-342.
253. Sun W., Bu Y., Wang Y. On the Binding Strength Sequence for Nucleic Acid Bases and C60 with Density Functional and Dispersion-corrected Density Functional Theories: Whether C60 could

protect nucleic acid bases from radiation-induced damage? // J. Phys. Chem.C Nanomater. Interfaces. - 2011.- Vol.115, N 8.- P.3220–3228.

254. Tallkvist J., Bowlus C.L., Lönnerdal B. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes//Toxicol Lett.- 2001.- Vol. 122, № 2.- P.171-177.

255. Tarantini A., Huet S., Jarry G., Lanceleur R., Poul M., Tavares A., Vital N., Louro H., João Silva M., Fessard V. Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 1: oral route // Environ Mol Mutagen. – 2015. – V.56, N.2. – P.218-227.

256. Tarantini A., Lanceleur R., Mourot A., Lavault M.T., Casterou G., Jarry G., Hogeveen K., Fessard V. Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line // Toxicol *In vitro*. – 2015. – V.29, N.2. – P. 398-407.

257. Thomas K.V., Farkas J., Farmen E. et al. Effects of dispersed aggregates of carbon and titanium dioxide engineered nanoparticles on rainbow trout hepatocytes // J Toxicol. Environ. Health A. – 2011. – Vol.74 (7-9). – P.466-477

258. Thomassen L.C., Aerts A., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Napierska D., Hoet P.H., Kirschhock C.E., Martens J.A. Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for *in vitro* cytotoxicity testing // Langmuir.– 2010.– Vol.26, № 1.– P. 328-335.

259. Tian C.H., Yang R.Z., Gulizhaer Y., Qian X., Wang J.H., Li H.M. Pollution Levels and Risk Assessment of Heavy Metals from Atmospheric Deposition in Nanjing // Huan Jing Ke Xue. – 2018. – V. 39. – №7. – P. 3118-3125. Doi: 10.13227/j.hj.kx.201709120.

260. Tran C.L., Buchanan D., Cullen R.T., et al. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance // Inhal. Toxicol. - 2000. - Vol.12, N.12. - P.1113-1126.

261. Tsai M.C., Chen Y.H., Chiang L. Y. Polyhydroxylated C60, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro // J. Pharm. Pharmacol. - 1997. - Vol.49, N.4. - P.438-445.

262. Tsaousi A., Jones E., Case C.P. The *in vitro* genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al₂O₃) and metal (CoCr alloy) particles// Mutat. Res.- 2010.- Vol.697, N 1-2.- P.1-9.

263. Trajković S., Dobrić S., Jaćević V., et al. Tissue-protective effects of fulleranol C60(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats // Colloids. Surf B. Biointerfaces. - 2007. - Vol.58, N.1. - P.39-43.

264. US NIOSH (2005). NIOSH Current Intelligence Bulletin: Evaluation of Health Hazard and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide. <http://www.cdc.gov/niosh/docs/preprint/TiO2>. - 2005.

265. Vahter M., Berglund M., Nermell B., Akesson A. Bioavailability of cadmium from shellfish and mixed diet in women // *Toxicol Appl Pharmacol.* – V.126, N.2. – P.332-341.
266. Vallee B.L., Ulmer D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead // *Annu Rev Biochem.* – 1972. – V. 41(10). – P. 91-128.
267. Vamanu C.I., Cimpan M.R., Høl P.J., et al. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line // *Toxicol. In vitro.* - 2008. - Vol.22, N 7.- P.1689-1696.
268. Van der Zande M. , Vandebriel R.J. , Groot M.J. , Kramer E. , Rivera Z.E.H., Rasmussen K., Ossenkoppele J.S., Tromp P., Gremmer E.R., Peters R.J.B., Hendriksen P.J., Marvin H.J.P., Hoogenboom R.L.A.P., Peijnenburg A.A.M., Bouwmeester H. Subchronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica// *Part. Fibre Toxicol.*- 2014.- Vol.11.- P.8.
269. van Ravenzwaay B., Landsiedel R. Fabian E., et al. Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz// *Toxicol. Lett.*- 2009.- Vol.186, N 3.- P.152-159.
270. Wada K., Fukuyama T., Nakashima N., Matsumoto K. Assessment of the *in vivo* genotoxicity of cadmium chloride, chloroform, and D,L-menthol as coded test chemicals using the alkaline comet assay // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* – 2015. – V. 786-788. – P. 114-119.
271. Wang J.J., Sanderson B.J., Wang H . Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells // *Mutat. Res.* - 2007a. - Vol.628, N.2. - P.99-106.
272. Wang H., Wick R.L., Xing B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*// *Environ. Pollut.*- 2009.- Vol.157, N 4.- P.1171-1177.
273. Wang Y.J., He Z.Z., Fang Y.W., Xu Y., Chen Y.N., Wang G.Q., Yang Y.Q., Yang Z., Li Y.H. Effect of titanium dioxide nanoparticles on zebrafish embryos and developing retina // *Int J Ophthalmol.* – 2014. – V.7, N.6. – P.917-923. – doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.06.01.
274. Warheit D.B., Hoke R.A.Finlay C., et al. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management // *Toxicol Lett.* - 2007 .- Vol.171, N.3.- P.99-110.
275. Warheit D.B., Webb T.R. Reed K.L., et al. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties // *Toxicology.* - 2007. - Vol.230, N.1. - P.90-104.
276. Winneke G., Brockhaus A., Ewers U., Krämer U., Neuf M. Results from the European multicenter study on lead neurotoxicity in children: Implications for risk assessment. // *Neurotoxicology and Teratology.* - 1990. – Vol. 12, Issue 5. – P. 553-559.
277. Win-Shwei T.-T., Fujimaki H. Nanoparticles and Neurotoxicity//*Int. J. Mol. Sci.*- 2011.- Vol.12, N 9.- P.6267–6280.

278. Wu J., Liu W., Xue C., et al. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure// *Toxicol. Lett.*- 2009.-Vol.191, N 1.- P.1-8.
279. Wu W.H., Sun X., Yu Y.P., et al. TiO₂ nanoparticles promote beta-amyloid fibrillation *in vitro* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2008. - Vol.373, N.2. - P.315-318.
280. Xu M.J., Tong G.H., Sun D., Li J.X., Yu X.Y. Comparison of Heavy Metal Contamination Characteristics in Surface Water in Different Functional Areas: A Case Study of Ningbo // *Huan Jing Ke Xue.* – 2017. – V. 38. – №8. – P. 3218-3224. Doi: 10.13227/j.hjcx.201701086.
281. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., et al. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // *Chem. Biol.* - 1995. - Vol.2, N.6. - P.385-389.
282. Yamawaki H., Iwai N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* - 2006. - Vol.290, N.6. - P.1495-1502.
283. Yang H., Wu Q., Tang M., Liu X., Deng H., Kong L., Lu Z. *In vitro* study of silica nanoparticle-induced cytotoxicity based on real-time cell electronic sensing system // *J. Nanosci. Nanotechnol.*– 2010.– Vol. 10, № 1.– P. 561-568.
284. Yang W.-W., Miao A.-J., Liu-Yan Yang L.-Y. Cd²⁺ Toxicity to a Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* as Influenced by Its Adsorption on TiO₂ Engineered Nanoparticles// *PLoS One.*- 2012/- Vol. 7, N 3.- P.e32300.
285. Yang X., Cai L., Peng Y. et al. Effects of Al(III) and Nano-Al₁₃ Species on Malate Dehydrogenase Activity// *Sensors (Basel).*- 2011.- Vol.11, N 6.- P.5740–5753.
286. Yang X.F., Fan G.Y., Liu D.Y., Zhang H.T., Xu Z.Y., Ge Y.M., Wang Z.L. Effect of cadmium exposure on the histopathology of cerebral cortex in juvenile mice // *Biol Trace Elem Res.* – 2015. – V.165, No.2. – P.167-172.
287. Yang X., Liu J., He H. SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. // *Part Fibre Toxicol.* – 2010. – Vol.7, N 1.– P.1-10.
288. Ye Y., Liu J., Xu J., Sun L., Chen M., Lan M. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line // *Toxicol. In vitro.*– 2010.– Vol. 24, №3.– P.751-758.
289. Yin J.J., Lao F., Meng J., et al. Inhibition of tumor growth by endohedral metallofullerenol nanoparticles optimized as reactive oxygen species scavenger // *Mol. Pharmacol.* - 2008. - Vol.74, N 4.- P.1132-40.
290. Yoo K.-C., Yoon C.-H., Kwon D. et al. Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation// *Int. J. Nanomedicine.*- 2012.- Vol.7.- P.1203–1214.

291. Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Yamashita K., Higashisaka K., Morishita Y., Kayamuro H., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. Promotion of allergic immune responses by intranasally-administrated nanosilica particles in mice // *Nanoscale Res. Lett.*– 2011.– Vol.6, № 1.– P.192–204.
292. Yu M., Mo Y., Wan R. et al. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells with exposure to metal nanoparticles. // *Toxicol. Lett.* - 2010. - Vol.195, N.1. - P.82-89.
293. Yu Y., Li Y., Wang W., Jin M., Du Z., Li Y., Duan J., Yu Y., Sun Z. Acute toxicity of amorphous silica nanoparticles in intravenously exposed ICR mice // *PLoS One.* – 2013. – V.8, N.4:e61346.
294. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/gaelp/ru/
295. Zhang Q.L., Li M.Q., Ji J.W., et.al. *In vivo* toxicity of nano-alumina on mice neurobehavioral profiles and the potential mechanisms// *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* -2011.-Vol.24, Suppl 1.- P.23S-29S.
296. Zhang Q., Xu H., Zheng S., Su M., Wang J. Genotoxicity of mesoporous silica nanoparticles in human embryonic kidney 293 cells // *Drug Test Anal.* – 2015. – V.7, N.9. – P.787-796.
297. Zhang X., Sun H., Zhang Z., et al. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles // *Chemosphere.* - 2007.- Vol.67, N.1.- P.160-166.
298. Zhao B., He Y.Y., Bilski P.J., Chignell C.F. Pristine (C60) and hydroxylated [C60(OH)24] fullerene phototoxicity towards HaCaT keratinocytes: type I vs type II mechanisms // *Chem. Res. Toxicol.* - 2008. - Vol.21, N.5. - P.1056-1063.
299. Zhao G., Huang Y., Li G., Li S., Zhou Y., Lei Y., Chen X., Yang K., Chen Y., Yang K. Subcellular distribution and genotoxicity of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cells // *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* – 2013. – V.16., N.3. – P. 117-124.
300. Zhu X., Chang Y., Chen Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. // *Chemosphere.* - 2010. - Vol.78, N.3. - P.209-215.