



Зайцева Н.В.<sup>1</sup>, Землянова М.А.<sup>1,2,3</sup>, Степанков М.С.<sup>1,2</sup>, Игнатова А.М.<sup>1,3</sup>,  
Николаева А.Е.<sup>1</sup>

## Особенности бионакопления и токсического действия наночастиц оксида меди (II) при многократной ингаляционной экспозиции

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, Пермь, Россия;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», 614990, Пермь, Россия

**Введение.** Активное использование в различных сферах хозяйственной деятельности, крупнотоннажный характер производства и наличие данных о токсичности обуславливают актуальность изучения эффектов наночастиц оксида меди (II) (НЧ CuO) на организм при ингаляционном воздействии. **Материалы и методы.** Установлены размер, площадь поверхности и объём пор НЧ CuO. Проведены изучение и оценка биохимических и гематологических параметров крови, степень бионакопления наноматериала, патоморфологических изменений органов крыс, экспонированных НЧ CuO. Исследования проведены в сравнении с микроразмерным аналогом (МЧ CuO).

**Результаты.** Размер НЧ CuO в составе нативного порошка меньше, чем у МЧ CuO, в 305 раз. Площадь поверхности и объём пор больше в 9,61 и 9,33 раза соответственно. После экспозиции НЧ CuO в крови крыс относительно контроля увеличены уровни активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (γ-ГТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), амилазы, антиоксидантной активности плазмы (АОА), малонового диальдегида (МДА), концентрация С-реактивного белка (СРБ) в 1,49–2,23 раза, снижено содержание мочевины в 1,41 раза; увеличены относительное число эозинофилов, количество лейкоцитов, относительная ширина распределения эритроцитов (RDW) в 1,31–5,39 раза, снижено относительное число сегментоядерных нейтрофилов в 1,37 и моноцитов в 1,42 раза. Действие НЧ в сравнении с МЧ более выражено по повышению активности АЛТ, АСТ, ЛДГ, МДА, концентрации СРБ в 1,25–1,68 раза и по снижению концентрации мочевины в 1,21 раза; по повышению доли эозинофилов в 2,37 и количества лейкоцитов в 1,61 раза. Концентрация меди при действии НЧ увеличивается относительно контроля в лёгких, печени, желудке, кишечнике и почках в 1,59–6,99 раза. Степень бионакопления наночастиц больше, чем у микрочастиц, в лёгких, печени, желудке, почках в 1,2–2,12 раза. Функциональные и патоморфологические изменения, вызванные НЧ CuO, более выражены в лёгких, желудке, тонком кишечнике в сравнении с микрочастицами.

**Заключение.** Подтверждено, что исследуемые частицы CuO являются наноматериалом. Обладают более выраженным бионакоплением и токсическим действием относительно микродисперсного аналога.

**Ключевые слова:** оксид меди (II); наночастицы; микрочастицы; бионакопление; ингаляция; токсичность

**Для цитирования:** Зайцева Н.В., Землянова М.А., Степанков М.С., Игнатова А.М., Николаева А.Е. Особенности бионакопления и токсического действия наночастиц оксида меди (II) при многократной ингаляционной экспозиции. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (10): 1139-1144.

<https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1139-1144>

**Для корреспонденции:** Землянова Марина Александровна, доктор мед. наук, профессор, зав. отд. биохимических и цитогенетических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь. E-mail: zem@fcrisk.ru

**Участие авторов:** Зайцева Н.В. — концепция и дизайн исследования, статистическая обработка материала, редактирование; Землянова М.А. — концепция и дизайн исследования, обработка материала, написание текста; Степанков М.С. — сбор материала, написание текста; Игнатова А.М., Николаева А.Е. — обработка материала. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 07.07.2021 / Принята к печати 28.09.2021 / Опубликована 31.10.2021

Nina V. Zaitseva<sup>1</sup>, Marina A. Zemlyanova<sup>1,2,3</sup>, Mark S. Stepankov<sup>1,2</sup>, Anna M. Ignatova<sup>1,3</sup>,  
Alena E. Nikolaeva<sup>1</sup>

## Features of bioaccumulation and toxic effects of copper (II) oxide nanoparticles under repeated inhalation exposure in rats

<sup>1</sup>Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation;

<sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, 614990, Russian Federation;

<sup>3</sup>Perm National Research Polytechnic University, Perm, 614990, Russian Federation

**Introduction.** Active use in various spheres of economic activity, large-scale production and the availability of data on toxicity determine the relevance of studying the effects of copper (II) oxide nanoparticles (CuO NPs) on the body during inhalation exposure.

**Material and Methods.** The size, surface area, and pore volume of CuO NPs were determined. The study and assessment of biochemical and hematological parameters of blood, the degree of bioaccumulation of nanomaterial, pathomorphological changes in organs of rats exposed to CuO NPs were carried out. The studies were carried out in comparison with a micro-sized analogue (CuO MPs).

**Results.** The size of CuO NPs in the composition of the native powder is 305.00 times less than that of CuO MPs. The surface area and pore volume are 9.61 and 9.33 times larger, respectively. After exposure to CuO NPs in the blood of rats relative to the control, the levels of activity of ALT, AST, ALP, GGT, LDH, amylase, AOA, MDA and the concentration of CRP increased by 1.49-2.23 times, the content of urea decreased by 1.41 times; relative number of eosinophils, leukocyte count, RDW by 1.31-5.39 times increased, relative number of segmented neutrophils decreased by 1.37 and monocytes by 1.42 times. The effect of NPs, in comparison with MPs, is more pronounced in increasing the activity of ALT, AST, LDH, MDA and the concentration of CRP by 1.25-1.68 times and in reducing the concentration of urea by 1.21 times; in increase the relative number of eosinophils by 2.37 and the count of leukocytes by 1.61 times. The concentration of copper

under the action of NPs increases relative to the control in the lungs, liver, stomach, intestines and kidneys by 1.59-6.99 times. The degree of bioaccumulation of nanoparticles is 1.20-2.12 times higher than that of microparticles in the lungs, liver, stomach, and kidneys.

**Conclusion.** Functional and pathomorphological changes caused by CuO NPs are more pronounced in the lungs, stomach, and small intestine in comparison with microparticles. It was confirmed that the studied CuO particles are nanomaterials. They have a more pronounced bioaccumulation and toxic effect relative to the microdispersed analogue.

**Keywords:** copper (II) oxide; nanoparticles; microparticles; bioaccumulation; inhalation; toxicity

**For citation:** Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Stepankov M.S., Ignatova A.M., Nikolaeva A.E. Features of bioaccumulation and toxic effects of copper (II) oxide nanoparticles under repeated inhalation exposure in rats. *Gigiene i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2021; 100(10) 1139-1144. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1139-1144> (In Russ.)

**For correspondence:** Marina A. Zemlyanova, MD, PhD, DSci., Professor, Head of Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Techniques Department, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: zem@fcrisk.ru

#### Information about authors:

Zaitseva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2356-1145> Stepankov M.S., <https://orcid.org/0000-0002-7226-7682> Zemlyanova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8013-9613> Ignatova A.M., <https://orcid.org/0000-0001-9075-3257> Nikolaeva A.E., <https://orcid.org/0000-0003-3119-3477>

**Contribution:** Zaitseva N.V. – the concept and design of the study, statistical processing of the material, editing; Zemlyanova M.A. – the concept and design of the study, processing of the material, writing the text; Stepankov M.S. – collection of material, writing the text; Ignatova A.M., Nikolaeva A.E. – processing of the material. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: July 7, 2021 / Accepted: September 28, 2021 / Published: October 31, 2021

## Введение

Наноматериалы обладают уникальными физико-химическими свойствами, обусловленными малым размером, высоким соотношением площади поверхности к объёму, поверхностным зарядом и др., что даёт им ряд преимуществ относительно микроразмерных материалов. Благодаря этому возрастает спектр применения наноматериалов во множестве областей хозяйственной деятельности человека, и, как следствие, производство нанодисперсных материалов приобрело крупнотоннажный характер [1]. Так, в 2016 году мировой объём произведённых наноматериалов достиг 3,5 млн тонн [2]. Результатом широкой распространённости и значительного объёма выпущенной продукции наноиндустрии может являться накопление наночастиц в объектах окружающей среды, что в дальнейшем может привести к экспозиции населения.

В настоящее время проведено множество исследований, доказывающих, что физико-химические свойства, присущие наноматериалам, позволяют им эффективно проникать через защитные барьеры организма, депонироваться в различных органах и тканях, вызывая повреждение клеточных структур и, в дальнейшем, патологические изменения морфологии и функций тканей органов [3]. При этом, как правило, негативные эффекты, вызываемые действием наноразмерных материалов, более выражены в сравнении с действием химических аналогов микронной размерности, что обуславливает актуальность гигиенических исследований, направленных на оценку воздействия наноматериалов на организм человека.

Характерным примером крупнотоннажного широко используемого продукта наноиндустрии являются наночастицы оксида меди (II) (НЧ CuO). Данный наноматериал применяется в медицине в бицидных препаратах; в косметологии – в продуктах личной гигиены; в электронике – в суперконденсаторах, полупроводниках, датчиках, солнечных батареях, сенсорах; в сельском хозяйстве – в составе удобрений и пестицидов; в аэрокосмической отрасли – в качестве катализатора горения топлива [4, 5]. Ожидается, что к 2025 году мировой объём производства НЧ CuO составит 1600 т/год, что примерно в 3 раза больше, чем в 2014 году (570 т/год) [6].

Согласно данным, представленным в научной литературе, НЧ CuO, проникая в организм, в результате прямой цитотоксичности способны генерировать свободные радикалы, что может приводить к развитию окислительного стресса [7], обуславливающего увеличение цитотоксического эффекта [8], развитие патоморфологических изменений тканей органов [9], генотоксический [10], иммунотоксический [11] и канцерогенный эффекты [9].

Широкий спектр применения, возрастающие объёмы производства и наличие данных о токсичности обуславливают актуальность изучения эффектов НЧ CuO на организм при различных путях поступления.

Цель исследования – изучение особенностей бионакопления и токсического действия НЧ CuO при многократной ингаляционной экспозиции крыс.

## Материалы и методы

В исследовании применяли порошок НЧ CuO (Sigma-Aldrich, США). Для сравнительного анализа использовали порошок микрочастиц оксида меди (II) (МЧ CuO) (Sigma-Aldrich, США).

Размер частиц измеряли по изображениям, полученным сканирующим микроскопом S-3400N (НИТАСНИ, Япония) методом растровой электронной микроскопии (РЭМ).

Удельную площадь поверхности частиц тестируемых порошков определяли с помощью прибора ASAP 2020 (Micromeritics, США) по методике, предложенной Брунауэром, Эмметом и Теллером (БЭТ) [12]. Общий объём пор рассчитывали по количеству адсорбированных на поверхности частиц азота с составлением изотерм десорбции методом Баррета, Джойнера и Халенды (БДХ) [13].

Экспериментальные исследования проведены на 30 крысах-самцах линии Wistar возрастом 6 нед со средней массой тела 180 г. Содержание экспериментальных животных в полиэтиленовых клетках при температуре 22 °С, с относительной влажностью воздуха 55%, с 12/12-часовым циклом свет/темнота в виварном помещении соответствовало требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или в иных научных целях (ETS № 123) (приложение А), и СП 2.2.1.3218-14. На протяжении эксперимента крыс обеспечили стандартным полнорационным кормом в виде твёрдых экструдированных гранул и чистой водой.

После двухнедельной адаптации животных случайным образом с помощью функции =СЛЧИС в Microsoft Excel распределили на 3 группы по 10 особей: опытная группа – для проведения многократной ингаляционной экспозиции аэрозолем НЧ CuO, группа сравнения – для проведения многократной ингаляционной экспозиции аэрозолем МЧ CuO, контрольная группа – животные, подвергнутые воздействию аэрозоля на основе бидистиллированной воды без содержания тестируемых материалов. Все манипуляции с крысами соответствовали Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или в иных научных целях (ETS № 123), и требованиями

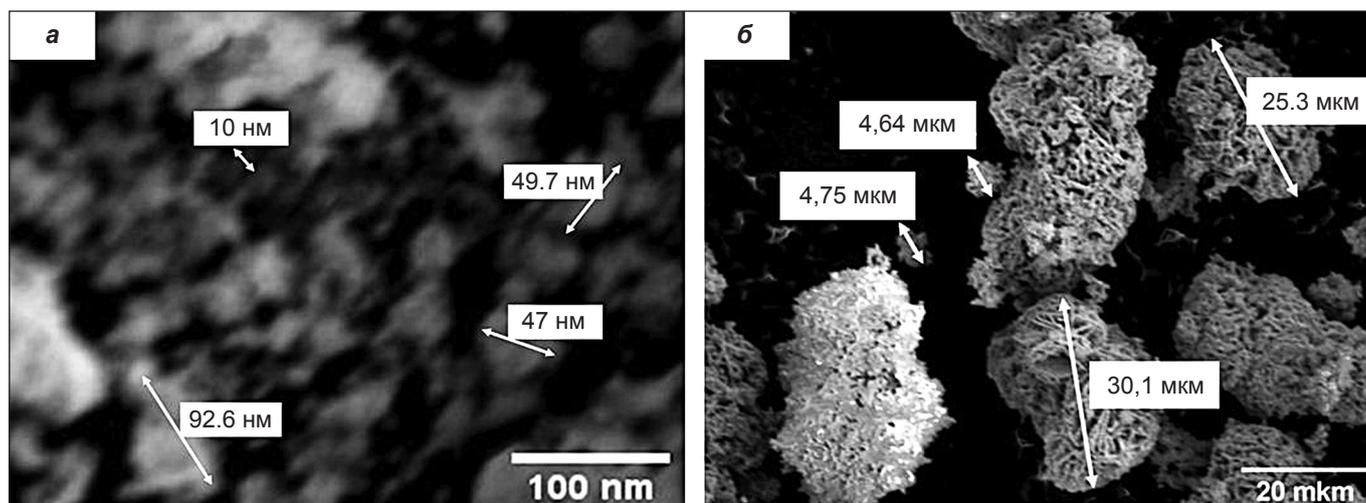


Рис. 1. Изображения образцов CuO, метод SEM: а – наночастицы; б – микрочастицы.

Fig. 1. Images of CuO samples, SEM method: а – nanoparticles; б – microparticles.

этического комитета ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения.

Ингаляционную экспозицию экспериментальных животных тестируемыми материалами проводили в ингаляционной системе с камерой для всего тела (TSE Systems GmbH, Германия) на протяжении 10 сут по 4 ч с применением подходов, указанных в ГОСТ 32646-2014. Водные суспензии, содержащие НЧ CuO и МЧ CuO в концентрации 125 мг/см<sup>3</sup>, переводили в форму аэрозоля при помощи форсунки ингаляционной системы. На протяжении каждой экспозиции в ингаляционной камере поддерживали постоянную циркуляцию воздуха (скорость входящего и исходящего потоков – 10 дм<sup>3</sup>/мин); скорость подачи суспензий в форсунку составила 0,4 см<sup>3</sup>/мин; изменения давления внутри экспозиционной камеры не превышали 0,4 мбар; фактическая концентрация НЧ CuO – 1,17 ± 0,18, МЧ CuO – 1,39 ± 0,21 мг/м<sup>3</sup>.

По окончании периода экспозиции у каждой крысы для исследования биохимических и гематологических показателей отбирали образцы крови из подязычной вены в объёме 3 см<sup>3</sup>. Биохимические показатели – уровни активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (γ-ГТ), амилазы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), концентрации билирубина общего, билирубина прямого, креатинина, мочевины и С-реактивного белка (СРБ) – определяли в сыворотке крови с помощью биохимического анализатора Keylab (BPC BioSed, Италия). Антиоксидантно-окислительный статус крови изучали по показателям содержания малонового диальдегида (МДА) и антиоксидантной активности плазмы (АОА) с помощью спектрофотометра ПЭ-5300В (Экрос, Россия). Гематологические показатели – относительное число эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит, средний объём эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитарной массе (MCHC), относительную ширину распределения эритроцитов (RDW), средний объём тромбоцитов (MPV), относительную ширину распределения тромбоцитов по объёму (PDW) и тромбокрит (PCT) – изучали на автоматическом анализаторе Coulter Ac\*Т 5diff AL (Beckman Coulter, США).

Перед отбором органов для изучения бионакопления и патоморфологических изменений животные были умерщвлены цервикальной дислокацией с последующей немедленной декапитацией. Бионакопление НЧ CuO и МЧ CuO изучали по показателю концентрации меди в

лёгких, печени, желудке, кишечнике, почках, головном мозге пяти крыс каждой группы и крови всех экспериментальных животных (120 образцов по 40 образцов из каждой группы). Отобранные органы на протяжении 9 ч подвергали термическому воздействию в муфельной печи при температуре 450–500 °С до получения негорячего остатка, который затем растворяли в азотной кислоте. Концентрации меди в полученных растворах определяли методом атомной абсорбции с атомизацией в пламени «ацетилен – воздух» на атомно-абсорбционном спектрофотометре Analyst-400 (Perkin Elmer, США).

Для обнаружения патологических изменений морфологии тканей органов проводили гистологический анализ лёгких, печени, желудка, кишечника, почек и головного мозга крыс. Извлечённые органы в количестве 90 штук (30 органов в каждой группе) фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина с добавлением фосфатного буфера с дальнейшей дегидратацией. Подготовку гистологических препаратов осуществляли из парафиновых срезов толщиной 3–4 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином. Полученные микропрепараты исследовали при помощи светооптического микроскопа Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ результатов исследования показателей крови крыс и бионакопления меди в тканях органов проводили расчётом *U*-критерия Манна – Уитни в программе Statistica 10. Различия полученных результатов считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

По результатам РЭМ средний размер НЧ CuO составил 45,86 нм, что в 305 раз меньше данного значения у МЧ CuO (13 987 нм) (рис. 1, а, б).

Удельная площадь поверхности НЧ CuO по результатам измерения методом БЭТ больше, чем у МЧ CuO, в 9,61 раза и составила 17,7 м<sup>2</sup>/г против 1,84 м<sup>2</sup>/г. Суммарный объём пор НЧ CuO, измеренный методом БДХ, составил 0,056 см<sup>3</sup>/г, что в 9,33 раза больше, чем у МЧ CuO (0,006 см<sup>3</sup>/г).

Исследование биохимических показателей крови животных, экспонированных НЧ CuO, позволило установить увеличение уровней активности АЛТ, АСТ, ЩФ, γ-ГТ, ЛДГ, амилазы, концентрации СРБ в 1,76 ( $p < 0,001$ ), 1,66 ( $p < 0,001$ ), 1,51 ( $p < 0,001$ ), 1,82 ( $p < 0,05$ ), 2,23 ( $p < 0,001$ ), 2,08 ( $p < 0,001$ ), 2 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно и снижение содержания мочевины в 1,71 раза ( $p < 0,001$ ) относительно контроля. При экспозиции МЧ CuO по сравнению с контролем увеличивается активность АЛТ, ЩФ, ЛДГ, амилазы, концентрация СРБ в 1,4 ( $p < 0,01$ ), 1,54 ( $p < 0,001$ ),

Таблица 1 / Table 1

**Биохимические параметры крови крыс ( $p \leq 0,05$ ),  $M \pm SD$**   
**Biochemical parameters of the rat blood ( $p \leq 0.05$ ),  $M \pm SD$**

| Параметр<br>Parameters   | Опытная группа<br>Experimental group | Группа сравнения<br>Comparison group | Контрольная группа<br>Control group |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| АЛТ, Е/дм <sup>3</sup><br>ALT, U/dm <sup>3</sup>                                   | 102.10 ± 26.89* ♦                    | 81.50 ± 13.11*                       | 58.10 ± 11.58                       |
| АСТ, Е/дм <sup>3</sup><br>AST, U/dm <sup>3</sup>                                   | 292.60 ± 50.31* ♦                    | 181.30 ± 35.53                       | 176.80 ± 11.85                      |
| ЩФ, Е/дм <sup>3</sup><br>ALP, U/dm <sup>3</sup>                                    | 257.80 ± 43.31*                      | 262.90 ± 43.40*                      | 170.70 ± 26.96                      |
| γ-ГТ, Е/дм <sup>3</sup><br>GGT, U/dm <sup>3</sup>                                  | 3.10 ± 1.37*                         | 3.00 ± 1.49                          | 1.70 ± 0.82                         |
| Амилаза, Е/дм <sup>3</sup><br>Amylase, U/dm <sup>3</sup>                           | 942.60 ± 122.35*                     | 998.80 ± 328.03*                     | 453.70 ± 40.67                      |
| Билирубин общий, мкмоль/дм <sup>3</sup><br>Total bilirubin, μmol/dm <sup>3</sup>   | 1.97 ± 0.31                          | 2.10 ± 0.20                          | 2.04 ± 0.49                         |
| Билирубин прямой, мкмоль/дм <sup>3</sup><br>Direct bilirubin, μmol/dm <sup>3</sup> | 1.37 ± 0.17                          | 1.41 ± 0.21                          | 1.45 ± 0.20                         |
| Креатинин, мкмоль/дм <sup>3</sup><br>Creatinine, μmol/dm <sup>3</sup>              | 68.30 ± 6.27                         | 66.30 ± 7.80                         | 69.90 ± 5.00                        |
| ЛДГ, Е/дм <sup>3</sup><br>LDH, U/dm <sup>3</sup>                                   | 2036.20 ± 742.09* ♦                  | 1215.70 ± 305.34*                    | 911.60 ± 33.99                      |
| Мочевина, ммоль/дм <sup>3</sup><br>Urea, mmol/dm <sup>3</sup>                      | 4.83 ± 0.58* ♦                       | 5.84 ± 0.57*                         | 8.26 ± 1.12                         |
| СРБ, мг/дм <sup>3</sup><br>CRP, mg/dm <sup>3</sup>                                 | 0.78 ± 0.03* ♦                       | 0.54 ± 0.06*                         | 0.39 ± 0.10                         |
| АОА, %<br>AOA, %   | 28.94 ± 3.83*                        | 28.36 ± 3.94*                        | 43.23 ± 1.55                        |
| МДА, мкмоль/см <sup>3</sup><br>MDA, μmol/cm <sup>3</sup>                           | 4.38 ± 0.30* ♦                       | 3.48 ± 0.29*                         | 2.54 ± 0.17                         |

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: \* – достоверное отличие от контроля; ♦ – достоверное отличие от группы сравнения.  
 Note. Here and in table 2, 3: \* – significant difference with control group; ♦ – significant difference with comparison group.

1,33 ( $p < 0,01$ ), 2,2 ( $p < 0,001$ ), 1,39 раза ( $p < 0,01$ ) соответственно, снижается содержание мочевины в 1,41 раза ( $p < 0,001$ ). У животных опытной группы относительно группы сравнения установлены более высокие уровни активности ряда ферментов в сыворотке крови: АЛТ, АСТ, ЛДГ в 1,25 ( $p < 0,05$ ), 1,61 ( $p < 0,001$ ), 1,68 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно и увеличено содержание СРБ в 1,44 раза ( $p < 0,001$ ). Отмечено снижение концентрации мочевины в 1,21 раза ( $p < 0,01$ ).

Установлены изменения биохимических показателей крови, связанные с развитием антиоксидантно-окислительных процессов в организме. В сыворотке крови животных опытной группы снижена АОА в 1,49 раза ( $p < 0,001$ ) и повышен уровень МДА в 1,72 раза ( $p < 0,001$ ) относительно контроля. Аналогичные изменения относительно контроля отмечены при экспозиции МЧ CuO: уровень АОА снижен в 1,52 раза ( $p < 0,001$ ), МДА повышен в 1,37 раза ( $p < 0,001$ ). Действие НЧ CuO отличается от действия МЧ CuO более высокой концентрацией МДА – в 1,26 раза ( $p < 0,001$ ) в сыворотке крови животных опытной группы. Результаты исследования биохимических показателей крови представлены в табл. 1.

Установленное изменение гематологических показателей крови животных после экспозиции НЧ CuO заключается в увеличении относительного числа эозинофилов, количества лейкоцитов, RDW в 5,39 ( $p < 0,001$ ), 1,95 ( $p < 0,001$ ), 1,31 раза ( $p < 0,001$ ) соответственно и снижении относительного числа сегментоядерных нейтрофилов в 1,37 раза ( $p < 0,001$ ) и моноцитов в 1,42 раза ( $p < 0,05$ ) относительно контроля. При экспозиции МЧ CuO у животных группы сравнения относительно контроля повышены относительное число эозинофилов, количество лейкоцитов, RDW в 2,28 ( $p < 0,001$ ), 1,22 ( $p < 0,01$ ), 1,34 ( $p < 0,001$ ) раза соответственно, снижена доля сегментоядерных нейтрофилов в 1,3 раза ( $p < 0,01$ ). Различия в изменениях гематологических показателей крови между животными групп опыта и сравнения отмечены в повышенной доле эозинофилов в 2,37 ( $p < 0,001$ ) и количестве лейкоцитов в 1,61 ( $p < 0,001$ ). Результаты исследования гематологических показателей крови представлены в табл. 2.

Исследование концентрации меди в тканях органов показало увеличение данного показателя после многократной ингаляционной экспозиции НЧ CuO у животных опыт-

ной группы относительно контроля в лёгких, печени, желудке, кишечнике и почках в 1,76 ( $p < 0,05$ ), 1,59 ( $p < 0,05$ ), 6,99 ( $p < 0,05$ ), 4,49 ( $p < 0,05$ ) и 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. При действии МЧ CuO установлено повышение концентрации меди в лёгких в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ), в печени – в 1,33 ( $p < 0,05$ ), в желудке – в 3,3 ( $p < 0,05$ ), в кишечнике – в 3,07 ( $p < 0,05$ ) и в почках – в 1,34 раза ( $p < 0,05$ ) относительно контроля. Сопоставление степени бионакопления между НЧ CuO и МЧ CuO позволило установить более высокие концентрации меди в лёгких, печени, желудке и почках животных опытной группы, превышающие значения изучаемого показателя в группе сравнения в 1,45 ( $p < 0,05$ ), 1,2 ( $p < 0,05$ ), 2,12 ( $p < 0,05$ ) и 1,87 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Результаты исследования концентрации меди в органах и крови представлены в табл. 3.

Гистологическими методами исследования у животных опытной группы после экспозиции НЧ CuO в лёгких зафиксирована гиперплазия лимфоидной ткани, ассоциированная со стенкой бронхов, с примесью большого количества эозинофилов, очаговая эозинофильная интерстициальная пневмония, острый эозинофильный бронхит, распространённые васкулиты, скопления коричневого пигмента в цитоплазме большого количества макрофагов, очаги эмфиземы, скопления эритроцитов в просвете альвеол и отёк (рис. 2, а–в, см. на вклейке). Изменения в лёгких животных группы сравнения схожи за исключением отсутствия эмфиземы, отёка и скопления эритроцитов в альвеолах (рис. 2, г, см. на вклейке). Острый эозинофильный гастрит установлен в желудке животных, экспонированных НЧ CuO и МЧ CuO. При этом только у животных опытной группы обнаружены скопления коричневого пигмента в цитоплазме макрофагов. Патоморфологические изменения тонкого кишечника животных групп опыта и сравнения характеризуются эозинофильным энтеритом и гиперплазией клеток Панета. Но у животных опытной группы в отличие от группы сравнения отмечена гиперплазия лимфоидной ткани. Патоморфологические изменения печени животных, экспонированных НЧ CuO и МЧ CuO, представлены в виде острого активного гепатита и полнокровия, почек – пролиферации мезангиальных клеток, толстого кишечника – распространённого эозинофильного колита. В тканях органов животных контрольной группы не установлено патоморфологических изменений.

Таблица 2 / Table 2

**Гематологические параметры крови крыс ( $p \leq 0,05$ ),  $M \pm SD$**   
**Hematological parameters of the rat blood ( $p \leq 0.05$ ),  $M \pm SD$**

| Параметр<br>Parameter  | Опытная группа<br>Experimental group | Группа сравнения<br>Comparison group | Контрольная группа<br>Control group |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Эозинофилы, %<br>Eosinophils, %  | 9.70 ± 2.87* ♦                       | 4.10 ± 0.88*                         | 1.80 ± 0.63                         |
| Палочкоядерные нейтрофилы, %<br>Stab neutrophils, %  | 1.80 ± 1.32                          | 1.20 ± 0.42                          | 1.20 ± 0.42                         |
| Сегментоядерные нейтрофилы, %<br>Segmented neutrophils, %  | 21.10 ± 2.51*                        | 22.30 ± 3.20*                        | 29.00 ± 4.24                        |
| Лимфоциты, %<br>Lymphocytes, %   | 64.30 ± 4.79                         | 67.10 ± 3.67                         | 63.60 ± 4.25                        |
| Моноциты, %<br>Monocytes, %  | 3.10 ± 1.20*                         | 5.30 ± 1.49                          | 4.40 ± 1.07                         |
| Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup><br>Leukocytes, 10 <sup>9</sup> /dm <sup>3</sup>          | 22.95 ± 3.71* ♦                      | 14.28 ± 1.93*                        | 11.75 ± 3.05                        |
| Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /дм <sup>3</sup><br>Erythrocytes, 10 <sup>12</sup> /dm <sup>3</sup>     | 9.60 ± 0.45                          | 9.78 ± 0.36                          | 9.33 ± 0.92                         |
| Гемоглобин, г/дм <sup>3</sup><br>Hemoglobin, g/dm <sup>3</sup>                                       | 176.80 ± 2.86                        | 164.60 ± 7.55                        | 162.10 ± 7.17                       |
| Гематокрит, %<br>Hematocrit, %   | 49.29 ± 2.17                         | 47.87 ± 2.10                         | 47.20 ± 1.78                        |
| MCV, фл<br>MCV, fL   | 52.32 ± 2.26                         | 51.31 ± 4.15                         | 51.50 ± 3.37                        |
| MCH, пг<br>MCH, pg   | 18.28 ± 0.80                         | 17.71 ± 1.48                         | 18.31 ± 1.06                        |
| MCHC, г/дм <sup>3</sup><br>MCHC, g/dm <sup>3</sup>   | 351.20 ± 8.28                        | 349.50 ± 3.69                        | 348.20 ± 6.49                       |
| RDW, %<br>RDW, %   | 17.11 ± 1.87*                        | 17.58 ± 2.14*                        | 13.09 ± 0.69                        |
| Уровень тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup><br>Platelets, 10 <sup>9</sup> /dm <sup>3</sup> | 155.40 ± 57.50                       | 160.60 ± 31.00                       | 160.10 ± 25.99                      |
| MPV, фл<br>MPV, fL   | 6.65 ± 0.33                          | 6.50 ± 0.32                          | 6.66 ± 0.31                         |
| PDW, %<br>PDW, %   | 15.73 ± 0.33                         | 15.50 ± 0.21                         | 16.32 ± 0.16                        |
| PCT, %<br>PCT, %   | 0.09 ± 0.05                          | 0.09 ± 0.02                          | 0.08 ± 0.03                         |

Таблица 3 / Table 3

**Концентрация меди в органах и крови крыс ( $p \leq 0,05$ ),  $M \pm SD$**   
**Concentration of copper in the rats organs and blood ( $p \leq 0.05$ ),  $M \pm SD$**

| Орган<br>Organ  | Опытная группа<br>Experimental group | Группа сравнения<br>Comparison group | Контрольная группа<br>Control group |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Лёгкие, мкг/г<br>Lungs, µg/g                            | 17.10 ± 1.99* ♦                      | 11.64 ± 0.30*                        | 9.70 ± 0.56                         |
| Печень, мкг/г<br>Liver, µg/g                            | 38.62 ± 1.98* ♦                      | 32.26 ± 5.05*                        | 24.30 ± 1.41                        |
| Желудок, мкг/г<br>Stomach, µg/g                         | 78.54 ± 18.70* ♦                     | 37.12 ± 5.93*                        | 11.24 ± 0.76                        |
| Кишечник, мкг/г<br>Intestines, µg/g                     | 122.72 ± 39.68*                      | 83.88 ± 13.14*                       | 27.36 ± 7.53                        |
| Почки, мкг/г<br>Kidneys, µg/g                           | 94.70 ± 23.78* ♦                     | 50.74 ± 5.48*                        | 37.92 ± 2.42                        |
| Мозг, мкг/г<br>Brain, µg/g                              | 18.98 ± 0.84                         | 20.16 ± 0.97                         | 20.08 ± 1.93                        |
| Кровь, мкг/см <sup>3</sup><br>Blood, µg/cm <sup>3</sup> | 1.47 ± 0.35                          | 1.33 ± 0.23                          | 1.32 ± 0.16                         |

## Обсуждение

На основании результатов проведённых исследований установлено, что тестируемый образец CuO по показателям размера, удельной площади поверхности и суммарного объёма пор является наноматериалом. Малый размер, высокие удельная площадь поверхности и суммарный объём пор НЧ CuO относительно МЧ CuO обуславливают более выраженные материальную и функциональную кумуляцию наноматериала по сравнению с микроразмерным аналогом.

Бионакопление НЧ CuO и МЧ CuO при ингаляционном поступлении не только в лёгких, но и в печени, желудке, кишечнике и почках, вероятно, можно объяснить их распространением по организму через кровеносное русло, куда они попадают благодаря своим малым размерам. В кровеносное русло также могут проникать ионы Cu<sup>2+</sup>, продуцируемые в ходе реакции диссоциации НЧ CuO в кислой среде лизосом клеток, в частности альвеолярных макрофагов, в которых они способны накапливаться [8, 14].

Гистологическим исследованием тканей органов животных после экспозиции НЧ CuO и МЧ CuO зафиксиро-

вано развитие воспалительных процессов в виде пневмонии, бронхита, гастрита, энтерита и колита, имеющих эозинофильный характер, а также васкулитов и гепатита, что отражается в увеличении количества лейкоцитов, в частности относительного числа эозинофилов и уровня активности СРБ в крови. Лейкоцитоз отмечен в ранее проводимых исследованиях *in vivo* при пероральной экспозиции и внутрибрюшинных инъекциях НЧ CuO [15, 16]. С воспалительными процессами можно связать развитие гиперплазии лимфоидной ткани в лёгких животных групп опыта и сравнения и в тонком кишечнике в опытной группе [17]. Пролиферация мезангиальных клеток почек может указывать на нарушение метаболизма [18], вызванное в нашем исследовании бионакоплением НЧ CuO и МЧ CuO и/или вероятным повреждением ультраструктур данных клеток. Развитие пролиферации мезангиальных клеток приводит к избыточному продуцированию матричных белков, факторов роста, хемокинов и цитокинов, в том числе интерлейкина-1β, фактора некроза опухоли альфа, фактора роста тромбоцитов и основного фактора роста фибробластов, которые в свою очередь участвуют

в восстановлении почечных клубочков или способствуют продолжающейся пролиферации, ведущей к прогрессирующим патологиям, таким как воспаление, дистрофия и некроз [18]. Несмотря на развитие патоморфологических нарушений тканей почек, не отмечено изменений специфических биохимических показателей (концентрации креатинина и мочевины не повышаются относительно контроля), но повышены уровни неспецифических ферментов, присутствующих в большом количестве в клетках тканей почек ( $\gamma$ -ГТ и ЛДГ). Изменение активности данных показателей вместе с увеличением активности в крови АЛТ, АСТ, ЩФ и снижением концентрации мочевины может быть связано с нарушением функций печени, вызванным острыми гепатитом и полнокровием [19]. В лёгких животных опытной группы после экспозиции НЧ CuO зафиксированы очаги эмфиземы, что согласуется с результатами ранее проведённого исследования на крысах, в ходе которого животных подвергали ингаляционному воздействию исследуемого наноматериала только через нос [14]. Развитие эмфиземы отмечено на фоне увеличения количества макрофагов, участвующих в воспалительных процессах, что характерно для данной патологии [20]. Коричневый пигмент, обнаруженный в цитоплазме макрофагов в лёгких животных групп опыта и сравнения и в желудке опытной группы, предположительно состоит из меди и её соединений. В головном мозге животных опытной группы не установлено увеличения концентрации меди и патоморфологических изменений при действии НЧ CuO, что указывает на неспособность данного наноматериала проникать через гематоэнцефалический барьер. Увеличение RDW в крови животных групп опыта и сравнения относительно контроля, вероятно, является реакцией на функциональное действие НЧ CuO и МЧ CuO на структурные элементы крови и/или органы кроветворения, приводящее к гетерогенности популяции эритроцитов [19].

Основная часть патоморфологических изменений тканей органов животных, экспонированных НЧ CuO и МЧ CuO, является следствием развития воспалительных процессов. Развитие воспалений, зафиксированное в исследовании, вероятнее всего, обусловлено окислительным стрессом, вызванным свободными радикалами, в частности, активными формами кислорода и азота. В пользу данного предположения свидетельствует снижение АОА и увеличение активности МДА в крови животных групп опыта и сравнения относительно контроля, что также отмечено при генерации свободных радикалов в ряде исследований, направленных на изучение токсичности НЧ CuO *in vitro* и *in vivo* [7, 10, 21].

## Заключение

1. Исследуемый образец CuO со средним размером частиц 45,86 нм, удельной площадью поверхности 17,7 м<sup>2</sup>/г и суммарным объёмом пор 0,056 см<sup>3</sup>/г является наноматериалом.
2. Бионакопление НЧ CuO более выражено, чем у МЧ CuO, и происходит преимущественно в лёгких, печени, почках, желудке, тонком и толстом кишечнике.
3. Функциональные изменения, вызываемые действием НЧ CuO, сопровождаются более выраженным относительно МЧ CuO изменением биохимических и гематологических показателей крови в виде повышения уровня активности АЛТ, АСТ, ЩФ,  $\gamma$ -ГТ, ЛДГ, амилазы, концентрации СРБ, МДА, снижения концентрации мочевины, АОА; повышения относительного числа эозинофилов, количества лейкоцитов, RDW и снижения относительного числа сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов.
4. Токсическое действие НЧ CuO более выражено по сравнению с МЧ CuO и проявляется в патоморфологических изменениях тканей лёгких, печени, почек, желудка, тонкого и толстого кишечника.

## Литература

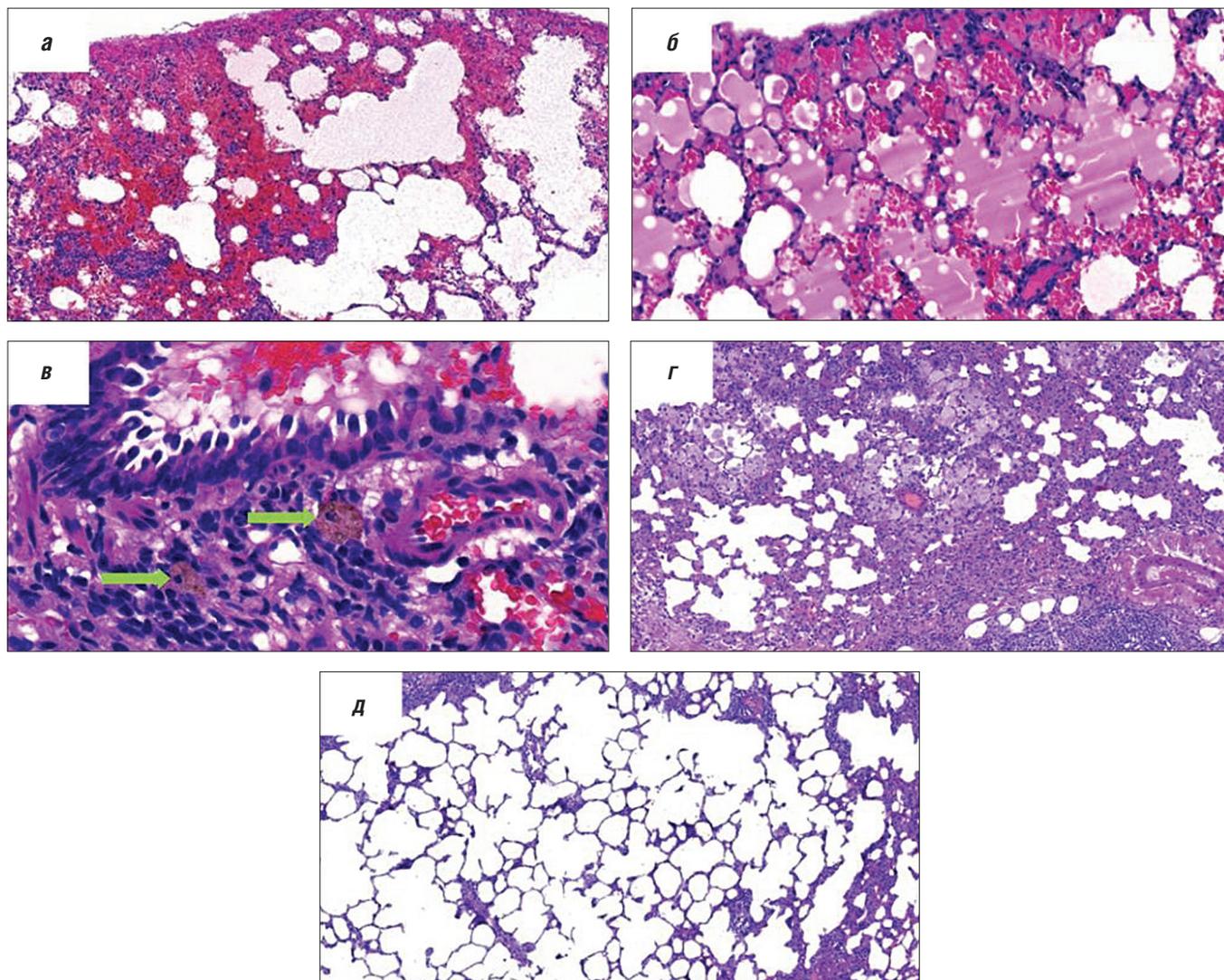
(п.п. 1–11, 13–18, 20, 21 см. References)

12. Грег С., Синг К. *Адсорбция, удельная поверхность, пористость*. М.: Мир; 1984.
19. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. *Клиническая оценка результатов лабораторных исследований*. М.: Медицина; 2006.
1. Ishakova E., Ishakov O. World market for nanomaterials: structure and trends. *MATEC Web Conf.* 2017; 129: 1–5. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201712902013>
2. Allied Market Research. Europe nanomaterials market by type of material, by end user – opportunity analysis and industry forecast, 2014–2022. Available at: <https://www.alliedmarketresearch.com/europe-nanomaterials-market>
3. Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Beresovoy M., Karaulov A., Nabiev I. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2018; 13(1): 44. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>
4. Ameh T., Sayes C.M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2019; 71: 103220. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>
5. Azonano. Copper Oxide (CuO) nanoparticles – Properties, Applications. Available at: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3395>
6. Hou J., Wang X., Hayat T., Wang X. Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms. *Environ. Pollut.* 2017; 221: 209–17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.066>
7. Sarkar A., Das J., Manna P., Sil P.S. Nano-copper induces oxidative stress and apoptosis in kidney via both extrinsic and intrinsic pathways. *Toxicology.* 2011; 290(2–3): 208–17. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.09.086>
8. Zhang J., Zou Z., Wang B., Xu G., Wu Q., Zhang Y., et al. Lysosomal deposition of copper oxide nanoparticles triggers HUVEC cells death. *Biomaterials.* 2018; 161: 228–39. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.048>
9. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurtvich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E., et al. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(7): 12379–406. <https://doi.org/10.3390/ijms150712379>
10. Perreault F., Pedroso Melegari S., Henning da Costa C., de Oliveira Franco Rossetto A.L., Popovic R., Gerson Matias W. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. *Sci. Total Environ.* 2012; 441: 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.065>
11. Naz S., Gul A., Zia M. Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET Nanobiotechnol.* 2020; 14(1): 1–13. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0176>
12. Gregg S.J., Sing K.S.W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*. London: Academic Press; 1982.
13. Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* 1951; 73: 373–80.
14. Gosens I., Cassee F.R., Zanella M., Manodori L., Brunelli A., Costa A.L. et al. Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure. *Nanotoxicology.* 2016; 10(8): 1084–95. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1172678>
15. Yahya R.A.M., Attia A.M., El-Banna S.G., El-Trass E.E., Azab A.E., Jbi-real J.M., et al. Hematotoxicity induced by copper oxide and/or zinc oxide nanoparticles in male albino rats. *J. Biotechnol.* 2019; 3(4): 1–7.
16. El Bialy B.E., Hamouda R.A., Abd Eldaim M.A., El Ballal S.S., Heikal H.S., Khalifa H.K., et al. Comparative toxicological effects of biologically and chemically synthesized copper oxide nanoparticles on mice. *Int. J. Nanomedicine.* 2020; 15: 3827–42. <https://doi.org/10.2147/IJN.S241922>
17. Khatami M. Developmental phases of inflammation-induced massive lymphoid hyperplasia and extensive changes in epithelium is an experimental model of allergy: implications for a direct link between inflammation and carcinogenesis. *Am. J. Ther.* 2005; 12(2): 117–26. <https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000143699.91156.21>
18. Abboud H.E. Mesangial cell biology. *Exp. Cell Res.* 2012; 318(9): 979–58. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.025>
19. Nazarenko G.I., Kishkun A.A. *Clinical Evaluation of Laboratory Research Results [Klinicheskaya otsenka rezul'tatov laboratornykh issledovaniy]*. Moscow: Meditsina; 2006.
20. Goldklang M., Stockley R. Pathophysiology of Emphysema and Implications. *Chronic. Obstr. Pulm. Dis.* 2016; 3(1): 454–8. <https://doi.org/10.15326/jcopdf.3.1.2015.0175>
21. Anreddy R.N.R. Copper oxide nanoparticles induces oxidative stress and liver toxicity in rats following oral exposure. *Toxicol. Rep.* 2018; 5: 903–4. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.022>

К статье

Зайцевой Н.В., Земляновой М.А., Степанкова М.С., Игнатовой А.М., Николаевой А.Е.  
Особенности бионакопления и токсического действия наночастиц оксида меди (II)  
при многократной ингаляционной экспозиции

To the article by Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Stepankov M.S., Ignatova A.M., Nikolaeva A.E.  
Features of bioaccumulation and toxic effects of copper (II) oxide nanoparticles under repeated  
inhalation exposure in rats



**Рис. 2. Микрофотографии лёгких крыс, окрашивание гематоксилин-эозином:**

*а* – опытная группа, участки эмфиземы и кровоизлияний, ув.  $\times 100$ ; *б* – опытная группа, альвеолярный отёк, ув.  $\times 200$ ;  
*в* – опытная группа, на зелёной стрелке макрофаги с коричневым пигментом в стенке бронха, ув.  $\times 400$ ;  
*г* – группа сравнения, ув.  $\times 100$ ;  
*д* – контрольная группа, ув.  $\times 100$ .

**Fig. 2. Micrographs of rat lungs, H&E staining:**

*a* – experimental group, areas of emphysema and hemorrhage, magnification 100 $\times$ ;  
*b* – experimental group, alveolar edema, magnification: 200 $\times$ ;  
*v* – experimental group, on the green arrow there are macrophages with brown pigment in the bronchial wall, magnification 400 $\times$ ;  
*г* – comparison group, magnification (100 $\times$ );  
*д* – control group, magnification: 100 $\times$ .