

УДК 54.31 : 615.099

РЕАКЦИЯ ГЛУБОКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ КРЫСЫ НА ОДНОКРАТНОЕ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ НИКЕЛЯ И МАРГАНЦА ИЛИ ИХ КОМБИНАЦИИ И ЕЕ ОСЛАБЛЕНИЕ БИОПРОТЕКТОРНОЙ ПРЕМЕДИКАЦИЕЙ

Б.А. Кацнельсон¹,
И.А. Минигалиева¹,
Л.И. Привалова¹, М.П. Сутункова¹,
В.Б. Гурвич¹, В.Я. Шур²,
Е.В. Шишкина², А.Н. Вараксин³,
В.Г. Панов³

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация

²Центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии» Уральского федерального университета, 620000, г. Екатеринбург, Российская Федерация

³ФГБУН «Институт промышленной экологии УрО» РАН, 620990, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Оксид никеля (II) и разнообразные химические формы марганца, включая оксид марганца (II, III), могут присутствовать вместе в субмикронной фракции сварочного дыма. Мы приготовили с помощью лазерной абляции в деионизированной воде металлических пластинок 99,99% чистоты суспензии наночастиц NiO со средним диаметром ($\pm\sigma$) 30 ± 12 нм и Mn_3O_4 32 ± 10 нм. Эти суспензии вводились интратрахеально крысам одна немедленно после другой в чередующейся последовательности или же изолированно (при этом для второго введения использовалась вода), и через 24 часа мы получали жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ). Увеличение общей клеточности БАЛЖ, числа альвеолярных макрофагов (АМ) и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), а особенно отношения НЛ/АМ (которое является надёжным сравнительным индексом цитотоксичности введенных частиц) было значительно выше при действии NiO, чем при действии Mn_3O_4 . Полуконтактная атомно-силовая микроскопия топографии поверхности клеток продемонстрировала активный эндоцитоз наночастиц NiO и Mn_3O_4 лёгочными фагоцитами. Более высокая пульмонарная цитотоксичность наночастиц NiO по сравнению с наночастицами Mn_3O_4 была показана также по увеличению активности некоторых лизосомальных ферментов в БАЛЖ. Математический анализ выявил субаддитивное комбинированное действие NiO и Mn_3O_4 , судя по клеточным показателям, в то время как по разным биохимическим – ад-

Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, bkaznelson@etel.ru

Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, ilzira-minigalieva@yandex.ru

Привалова Лариса Ивановна (Privalova Larisa Ivanovna), доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, privaloval@yahoо.com

Сутункова Марина Петровна (Sutunkova Marina Petrovna), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, sutunkova@ymrc.ru

Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich), доктор медицинских наук, директор ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, gurvich@ymrc.ru

Шур Владимир Яковлевич (Shur Vladimir Yakovlevich), доктор физико-математических наук, профессор, директор Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии», 620000, г. Екатеринбург, vladimir.shur@usu.ru

Шишкина Екатерина Владимировна (Shishkina Ekaterina Vladimirovna), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии», 620000, г. Екатеринбург, ekaterina.shishkina@labfer.usu.ru

Вараксин Анатолий Николаевич (Varaksin Anattolij Nikolayevich), доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии, нанотехнологии, 620990, г. Екатеринбург, varaksin@esko.uran.ru

Панов Владимир Григорьевич (Panov Vladimir Grigoryevich), кандидат физико-математических наук, зав. лабораторией математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии, нанотехнологии, 620990, г. Екатеринбург, rapov@esko.uran.ru

дитивность, субаддитивность либо синергизм. У крыс, которые в течение 4 недель перед введением $\text{NiO} + \text{Mn}_3\text{O}_4$ (по 0,25 мг каждого) получали перорально глютамат, глицин, ацетил-цистеин, иод и селеносодержащий поливитаминовый препарат, наночастицы вызвали существенно менее выраженную мобилизацию НЛ, чем при такой же экспозиции без премедикации.

Ключевые слова: наночастицы, оксид никеля, оксид марганца, бронхоальвеолярный лаваж, лёгочная цитотоксичность, комбинированное действие, биопротекторы

Введение. Публикации по экспериментальной токсикологии металлических и металло-оксидных наночастиц (НЧ), появившиеся за последние несколько лет, исчисляются многими десятками, однако в этой обширной литературе мы не встретили работ, в которых исследовались бы закономерности комбинированной токсичности таких НЧ. Крайне мало и опубликованных исследований, в которых бы в параллельно проведенных экспериментах сравнивалась токсичность равноразмерных НЧ разных металлов. Между тем оба вопроса имеют важное значение, в особенности, если не ограничиваться задачей частной токсикологической характеристики многочисленных товарных наноматериалов (в том числе и металло-содержащих), изготавливаемых с заданными свойствами для использования в науке, технике, медицине и т.д., а развивать гигиеническую нанотоксикологию металлов в связи с загрязнением воздуха при многих высокотемпературных технологиях аэрозолями конденсации с преобладанием частиц субмикронной, в том числе нанометровой размерности.

В реальных производственных условиях наличие в воздухе наночастиц, содержащих только один какой-либо металл, является достаточно редким исключением, а комбинированное загрязнение несколькими металлами – правилом. Так, при электродуговой сварке в воздух рабочего помещения выделяются в разных количественных соотношениях (в зависимости от элементного состава свариваемой стали, металла сварочного электрода или проволоки, защитной газовой атмосферы и некоторых других технических характеристик процесса) разные соединения железа, хрома, марганца, никеля, а нередко и других металлов. Однако, учитывая сложность проблемы комбинированной токсичности в целом и трудности её анализа [1, 2], преобладающей тенденцией всё ещё является исследование не многофакторных, а бинарных комбинаций и обсуждение соответствующих математических моделей. Этот шаг тем более оправдан, когда речь идёт о практически первых подходах к изучению комбинированной токсичности наночастиц.

В качестве первого объекта такого исследования мы остановились на никель-марганцевой комбинации. По литературным данным [3, 4, 5], в составе сварочных дымов никель встречается

в форме никель (II) оксида (NiO), а марганец в виде большого числа кислородных соединений, одним из которых является марганец (II, III) оксид (Mn_3O_4), что и побудило нас изучить сравнительную и комбинированную токсичность соответствующих НЧ.

Защитные и патологические реакции лёгких на любые частицы, загрязняющие вдыхаемый воздух, имеют ключевое значение, а давно известное хорошее соответствие этих реакций, развивающихся в ответ на однократное интратрахеальное введение малых доз суспензий, с теми, которые наблюдаются при ингаляции соответствующих аэрозолей, обуславливают адекватность интратрахеального введения как экспериментальной модели реальных ингаляционных экспозиций. Наш опыт [6, 7, 8, 9] свидетельствует о том, что это справедливо и в области нанотоксикологии.

Материалы и методы исследования. С помощью лазерной абляции поверхности металлической пластины никеля или марганца 99,99% чистоты в стерильной деионизированной воде были получены суспензии частиц со средним ($\pm\sigma$) диаметром, соответственно 30 ± 12 нм и 32 ± 10 нм. Судя по данным рентгеноструктурного анализа, в составе этих НЧ никель находится в форме NiO , а марганец – в форме Mn_3O_4 .

Наносуспензия NiO была высокостабильной, в то время как НЧ Mn_3O_4 проявляли склонность к быстрой агрегации, что потребовало ресуспендирования их с помощью ультразвука непосредственно перед экспериментом на животных. Эта агрегация резко ускорилась при смешивании суспензий (в связи с противоположными зарядами НЧ), поэтому нами была предварительно отработана описываемая ниже методика отдельной интратрахеальной экспозиции крыс.

Эксперимент был проведен на аутбредных белых крысах-самках весом 150–220 г по 12 особей в каждой подопытной и контрольной группе. Наносуспензии вводились интратрахеально крысам в объёме 1 мл (0,25 мг металлооксидных НЧ) одна немедленно после другой в последовательности, чередующейся для разных крыс, или же только одна из них (в этом случае для второго введения использовалась деионизированная вода, которая у контрольных крыс использовалась для обоих введений). Во избежание дополнительного травмирования гортани и трахеи,

введенная под визуальным контролем затупленная игла оставалась *in situ* и производилась быстрая замена шприца, непосредственно перед этим заполненного второй суспензией или водой.

Для цитологического и биохимического исследования использовали жидкость, полученную при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) через 24 часа после интратрахеального введения суспензий НЧ и/или воды, на которой они готовились. После подсчёта меланжерным способом общей клеточности в аликвотной пробе БАЛЖ отцентрифугированный клеточный осадок использовался: (а) для приготовления мазков, окрашиваемых по Гимза-Романовскому, в которых производился дифференциальный подсчёт клеток при оптической микроскопии с иммерсией; (б) для изучения топографии поверхности клеток при полуконтактной атомно-силовой микроскопии (пкАСМ). Техника этих исследований детально описывалась нами ранее [6, 7, 8]. В надосадочной (бесклеточной) фракции БАЛЖ проводились биохимические определения, рассматриваемые в следующем разделе статьи.

В дополнительном эксперименте крысы подвергались только комбинированному интратрахеальному воздействию $Mn_3O_4 + NiO$ по той же методике, но половина этих животных, как и половина тех, кому интратрахеально ввели только воду, получали с кормом и питьём на протяжении предшествовавших 4 недель комплекс предположительных биопротекторов: глютамат натрия, глицин, ацетил-цистеин, иодистый калий и селеносодержащий поливитаминный препарат.

Оценка статистической значимости различий между групповыми средними показателями, характеризующими каждый из вышеописанных вариантов воздействия, проводилась по *t*-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Тип комбинированной токсичности оценивался с помощью построения изобол для полного факторного эксперимента с двумя двухуровневыми факторами, где в качестве математического выражения для данного показателя (отклика) была взята линейная модель с перекрестным членом [2, 10]. После построения этой модели по экспериментальным данным изоболы получаются как геометрическое место точек, имеющих заданное постоянное значение отклика.

Результаты и обсуждение. Данные оптиче-

ской микроскопии, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что оба вида испытанных НЧ, отложившихся в глубоких дыхательных путях, вызывают резкое и статистически значимое увеличение (по сравнению с контрольной БАЛЖ) общей клеточности и абсолютного числа нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) и менее выраженное (но при действии НЧ оксида никеля тоже статистически значимое) увеличение числа альвеолярных макрофагов (АМ). При этом статистически значимо и резко повышено по сравнению с контролем численное отношение НЛ/АМ, которое является косвенным, но высоко информативным показателем цитотоксического действия любых интратрахеально введенных или ингалированных малорастворимых частиц, поскольку его увеличение связано с преобладающей мобилизацией НЛ в ответ на действие продуктов разрушения АМ [11, 12]. Как видно из таблицы 1, по всем четырём показателям реакция на нано-NiO превышает реакцию на нано- Mn_3O_4 (по двум из них – статистически значимо), а реакция на комбинированное воздействие $Mn_3O_4 + NiO$ занимает промежуточное положение¹. Это свидетельствует о более высокой пульмонарной цитотоксичности нано-NiO₂ и, вместе с тем, указывает на вероятно субаддитивный характер комбинированной токсичности.

Последнее предположение подтверждается математическим анализом данных, который по всем 4 клеточным показателям привёл к построению изобол, выгнутых вверх, что, как известно [1, 2, 13], характеризует именно субаддитивность (скрытый антагонизм) комбинированного действия. Более того, математическое моделирование предсказывает, что на уровне высоких доз оксида никеля он действует в направлении, как бы противоположном действию оксида марганца, что отражается изменением наклона изоболы. Всё это иллюстрируется на примере показателя НЛ/АМ (рис. 1)^{2,3}

При пк-АСМ фиксированных клеток БАЛЖ у крыс, которым были введены оба типа наночастиц, обнаружено, что их поверхность, в отличие от почти гладкой поверхности клеток контрольных крыс, испещрена «ямками», которые являются следом инвагинации плазматической мембраны фагоцита как первой фазы эндоцитоза частиц (рис. 2). Этот феномен, ранее впервые наблюдавшийся нами в экспериментах с нано- и

¹ Между подгруппами, в которых сравниваемые НЧ вводили в разном порядке, различий не было.

² Об этом же свидетельствовали не приводимые в данной статье результаты другого эксперимента, в котором НЧ сопоставлялись при дозировке 0,5 мг на крысу.

³ Отметим, что ранее в исследованиях нашей лаборатории [14] на примере оксида марганца (II) и хромата бария была впервые показана субаддитивность как преобладающий тип комбинированного действия полидисперсных микрометровых частиц на фагоцитарную реакцию лёгких (в частности, на показатель НЛ/АМ) при интратрахеальном введении, а также на жизнеспособность макрофагов «*in vitro*».

Таблица 1

Число клеток в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа, проведенного через 24 часа после интратрахеального введения стерильной деионизированной воды или водных суспензий наночастиц оксидов никеля и/или марганца ($M \pm m$)

Введено	Число клеток ($\times 10^6$)			НЛ/АМ
	всех	нейтрофильных лейкоцитов (НЛ)	альвеолярных макрофагов (АМ)	
Нано-оксид никеля nNiO	9,81 \pm 1,8*	5,43 \pm 1,3*	4,38 \pm 0,6*	1,20 \pm 0,3*
Нано-оксид марганца nMn ₃ O ₄	4,37 \pm 1,4*	1,84 \pm 0,8*	2,49 \pm 0,7	0,67 \pm 0,3*
nMn ₃ O ₄ + nNiO	6,39 \pm 1,3*	3,12 \pm 0,8*	3,27 \pm 0,7*	0,95 \pm 0,3*
Вода	1,28 \pm 0,5	0,07 \pm 0,02	1,21 \pm 0,5	0,06 \pm 0,01

Примечание: * – статистически значимое отличие от группы «вода»; • – от группы «nNiO» ($p < 0.05$ по t Стьюдента).

микрочастицами магнетита [6,7], серебра [8] и золота [8], а также оксида меди [9], свидетельствует о том, что АМ и НЛ, мобилизуемые на свободную поверхность дыхательных путей, действительно участвуют в важнейшем механизме их самоочищения от отложившихся НЧ.

Во всех этих экспериментах мы находили, что средний диаметр «ямок» всегда несколько выше среднего диаметра введенных частиц, но коррелирует с ним. В данном случае этот средний диаметр ($\pm s_x$) был равен $45,4 \pm 0,6$ нм при действии НЧ оксида никеля, $44,4 \pm 1,6$ нм при действии НЧ оксида марганца и $42,7 \pm 0,7$ нм при комбинированном действии НЧ, т.е. практически совпадал, что вполне соответствует близости средних размеров самих НЧ. Среднее число ямок на 1 мкм^2 поверхности в сравниваемых группах также было близким: соответственно $11,5 \pm 1,9$, $17,6 \pm 2,6$ и $16,5 \pm 1,5$ (в контроле – $1,2 \pm 0,3$). Этот результат отличается от полученных в наших экспериментах с другими нанометаллами, в которых более цитотоксичные НЧ всегда поглощались клетками более активно (и потому вызывали образование большего числа «ямок»), чем менее цитотоксичные.

К показателям цитотоксического повреждения фагоцитирующих клеток дыхательных путей (а возможно, и их эпителия) частицами, наряду с цитологическими данными, относят также некоторые внеклеточные биохимические характеристики БАЛЖ. Так, например, существенные различия динамики содержания лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы наблюдались при хронической ингаляции пыли кварца, асбеста и

диоксида титана [15]. Активность ЛДГ в БАЛЖ через 24 часа после интратрахеального введения частиц высоко цитотоксичного стандартного кварца DQ12 также была повышена в большей степени, чем после введения наночастиц TiO₂, но в гораздо меньшей, чем после введения наночастиц кобальта и особенно никеля [16]. В другом эксперименте эти же исследователи [17] нашли, что через 3 дня после интратрахеально-

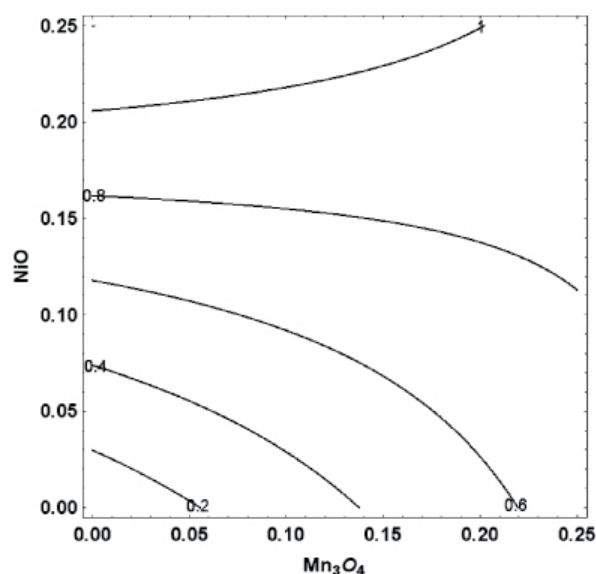


Рис. 1. Изоболы, построенные математической моделью комбинированной цитотоксичности наночастиц оксидов никеля и марганца. По осям координат – дозы в мг, числа возле кривых обозначают тот уровень отклика на комбинированное воздействие (в данном случае – показателя НЛ/АМ), которому соответствует данная изоболоа.

го введения никелевых частиц диаметром 20 нм существенно большее повышение концентрации ЛДГ (а также общего белка и фактора некроза опухоли – альфа) по сравнению с контролем, чем после введения частиц Ni диаметром 5 мкм. Мы сами [9] описали подобные сдвиги после интратрахеального введения медьсодержащих субмикронных и особенно наночастиц. Повышение концентрации лизосомальных ферментов в БАЛЖ обычно объясняют их релизом в результате повреждения частицами фаголизосом макрофага, а также эпителиальных клеток.

Как видно из наших новых данных, приведенных в таблице 2, при действии наночастиц оксидов никеля и марганца, наряду с повышением концентрации ЛДГ, была повышена по сравнению с контролем также концентрация двух других ферментов, имеющих лизосомальную фрак-

цию (амилазы и гамма-глутамилтрансферазы). Однако статистически значимым это повышение оказалось только при комбинированной экспозиции и только по двум показателям (ЛДГ и амилаза). При изолированном воздействии различие между рассматриваемыми эффектами NiO и Mn₃O₄ статистически не значимо, но имеет тот же знак, что и по клеточным показателям БАЛЖ (т.е. NiO оказывается однозначно более токсичным). Однако, в отличие от клеточных показателей, сдвиги биохимических данных в группе комбинированного действия занимают не промежуточный, а наивысший уровень, что позволяет думать о преобладании аддитивности эффектов. Действительно, математический анализ комбинированного действия по этим показателям выявил аддитивность (по ЛДГ) или лишь небольшое от неё отклонение в

Таблица 2

Активность некоторых ферментов в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже у крыс через 24 часа после интратрахеального введения наночастиц оксидов марганца и/или никеля, единицы/литр ((M ± m)

Введено	Гамма-глутамилтранспептидаза	Амилаза	Лактатдегидрогеназа
Нано-оксид никеля nNiO	3,64±1,05	8,86±2,97	108±41,30
Нано-оксид марганца nMn ₃ O ₄	2,76±0,67	7,48±1,98	42±8,22
nNiO+ nMn ₃ O ₄	6,12±2,16	9,16±2,65*	133±46,69*
Вода	1,97±0,31	3,6±0,51	32,5±4,17

Примечание: * – статистически значимое отличие от группы «вода».

Таблица 3

Число клеток в жидкости бронхоальвеолярного лаважа через 24 часа после комбинированного интратрахеального введения крысам суспензий наночастиц оксидов марганца и никеля после приема БПК или без него (M ± m)

Группы крыс	Число клеток * 10 ⁶			НЛ/АМ
	общее	нейтрофильные лейкоциты (НЛ)	альвеолярные макрофаги (АМ)	
Наноникель+ наномарганец	9,6±1,6*	7,17±1,24*	2,3±0,43	3,44±0,62*
Наноникель+ наномарганец после БПК	5,7±1,49	3,36±1,38*●	2,3±0,29	1,46±0,54*●
Контроль на БПК	3,8±0,75	0,67±0,21	3,09±0,64	0,23±0,07
Контроль интактный	3,8±0,9	0,34±0,12	3,4±0,86	0,12±0,05

Примечание: * – статистически значимое отличие от показателя группы «интактный контроль»; ● – статистически значимое отличие от показателя группы «Наноникель+ наномарганец».

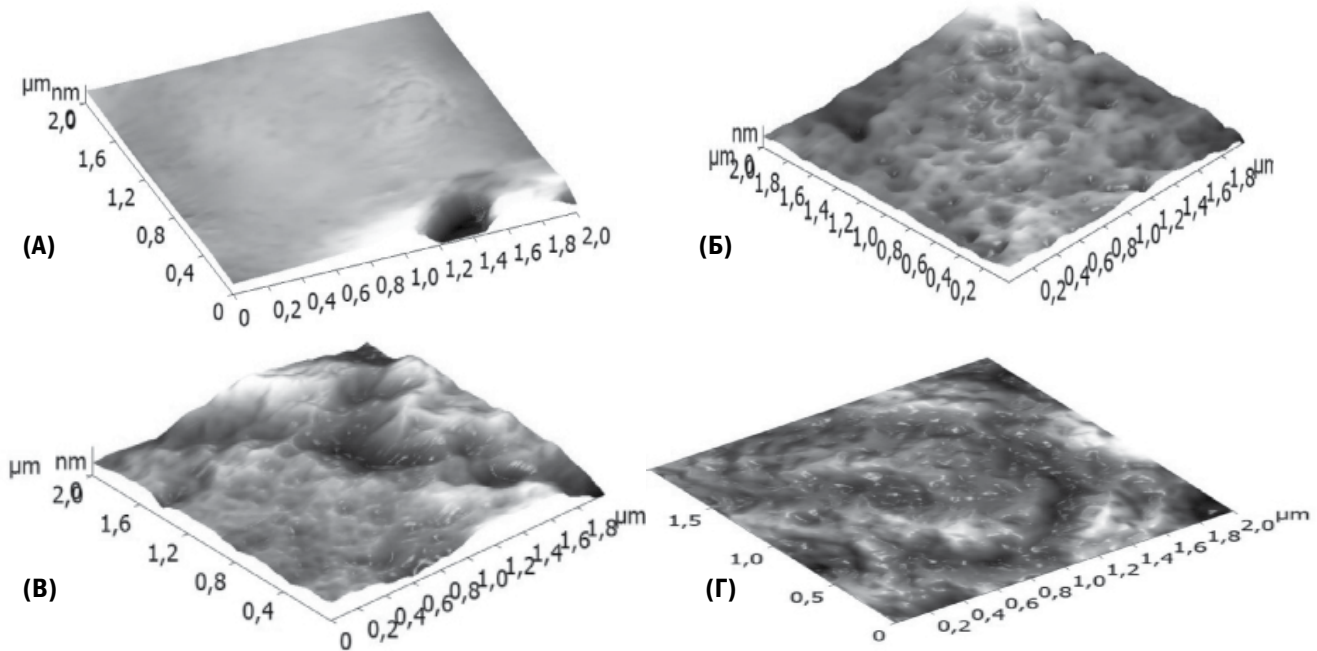


Рис. 2. Визуализация с помощью полуконтактной атомно-силовой микроскопии топографии поверхности альвеолярного макрофага контрольной крысы (А) и после интратрахеального введения наночастиц оксида никеля (Б), оксида марганца (В) или их комбинации (Г)

сторону либо суб- (по амилазе), либо супераддитивности (по гамма-глутамилтранспептидазе).

В таблице 3 показаны результаты того эксперимента, в котором по цитологическим характеристикам БАЛЖ сравнивалась реакция лёгких на комбинированное воздействие наночастиц NiO и Mn₂O₃ у крыс, подготовленных предварительным пероральным назначением биопротекторного комплекса (БПК), и у крыс, его не получавших. Как видно из этих данных, под влиянием БПК за счёт ослабленной мобилизации нейтрофильных лейкоцитов был в 2,4 раза статистически значимо снижен показатель НЛ/АМ, то есть организм реагировал на введенные наночастицы как на менее цитотоксичные, что свидетельствует о повышении резистентности к их действию.

Заключение. Показано, что наночастицы оксида никеля (II) обладают, судя как по цитологической характеристике БАЛЖ, так и по релизу лизосомальных ферментов во внеклеточную среду, более высокой лёгочной цитотоксичностью, чем близкие по размеру наночастицы

оксида марганца (II, III), но фагоцитируются примерно в равной степени активно. Их комбинированное действие на лёгкие является субаддитивным по показателям клеточной реакции, в то время как судя по разным биохимическим показателям, оно характеризуется либо аддитивностью, либо небольшими отклонениями от неё в ту или иную сторону. Предварительная субхроническая подготовка животных комбинацией биопротекторов, направленных как на неспецифическое повышение защитной реактивности, так и на некоторые звенья токсикодинамики никеля и марганца, повысила резистентность организма к цитотоксичности этих наночастиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кацнельсон Б.А. Комбинированное действие химических веществ. В кн.: Общая токсикология (ред. Б.А. Курляндский, В.А. Филлов). М.: Медицина. 2002: 497-520.
2. Varaksin A.N., Katsnelson B.A., Panov V.G., Privalova L.I., Kireyeva E.P., Valamina I.E., Beresneva O.Yu. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead. Food Chem. Toxicol. 2014; 64: 144-156.
3. Keane M., Stone S., Chen B. Welding fumes from stainless steel gas metal arc processes contain multiple manganese chemical species. J. Environ. Monit. 2010; 12: 1130-1140.
4. Taube F. Manganese in occupational arc welding fumes - aspects on physicochemical properties, with focus on solubility. Ann. Occup. Hyg. 2012; 57: 6-25.
5. Andujar P., Simon-Deckers A., Galateau-Salle F., Fayard B., Beaune G., Clin B., Billon-Galland M.-A., Duruphy O., Pairon J.-C., Doucet J., et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. Part. Fibres Toxicol. 2014; 11: 23.
6. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., Minigaliev I.A., Kireyeva E.P., Khodos M.Y., Kozitsina A.N., et al. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: Are we defenseless against nanoparticles? Int. J. Occup. Environ. Health. 2010; 16: 508-524.
7. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., Minigaliev I.A., Kireyeva E.P., Kozitsina A.N., Malakhova N.A., Glazyrina J.A., et al. Experimental estimates of the toxicity of iron oxide Fe₃O₄ (magnetite) nanoparticles. Cent. Eur. J. Occup. Environ. Med. 2010; 16: 47-63.
8. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Makeyev O.H., Shur V.Y., Beikin J.B., Sutunkova M.P., Kireyeva E.P., Minigaliev I.A., Loginova N.V., et al. Comparative in vivo assessment of some adverse bio-effects of equidimensional gold and silver nanoparticles and the attenuation of nanosilver's effects with a complex of innocuous bioprotectors. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 2449-2483.
9. Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А., Логинова Н.В., Гурвич В.Б., Шур В.Я., Бейкин Я.Б., Сулункова М.П., Минигалиева И.А., Шишкина Е.В., Пичугова С.В., Тулакина Л.Г., Беляева С.В., Рузаков В.О. Цитологические и биохимические особенности жидкости, получаемой при бронхо-альвеолярном лаваже у крыс после интратрахеального введения наноразмерных меднооксидных частиц // Токсикол. вестник. 2014; № 5.
10. Gessner P.K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. Toxicology. 1995; 105: 161-179.
11. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Osipenko A.B., Yushkov B.H., Babushkina L.G. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity. Environm. Health Perspect. 1980; 35: 205-218.
12. Katsnelson B.A., Privalova L.I. Recruitment of phagocytizing cells into the respiratory tract as a response to the cytotoxic action of deposited particles. Environ. Health Perspect. 1984; 55: 313-325.
13. Gennings C. On testing for drug/chemical interaction: definitions and inference. J. Biopharm. Stat. 2000; 10(4): 457-467.

14. Кацнельсон Б.А., Балежин С.Л., Давыдова В.И., Неизвестнова Е.М., Привалова Л.И., Коньшева Л.И. Закономерности, экспериментальные и математические методы оценки комбинированного токсического действия металлов. Материалы докладов пленумов правлений Всесоюзного и армян. науч.

обществ токсикологов, посвященные вопросам комбинированного действия химических веществ на организм. Ереван, 1989:14-17.

15. Donaldson K., Bolton R., Jones E. A., Brown G. M., Robertson M. D., Slight J., Cowie H., Davis J.M.G. Kinetics of the bronchoalveolar leucocyte response in

rats during exposure to equal airborne mass concentrations of quartz, chrysotile asbestos, or titanium dioxide. *Thorax*. 1988;43: 525-533.

16. Zhang Q., Yukinori K., Sato K., Nakakuki K., Koyahama N., Donaldson K. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine

metals: role of free radicals. *J. Toxicol. Environ. Health*. 1998; 53: 423-438.

17. Zhang Q., Yukinori K., Zhu X., Sato K., Mo Y., Kluz T., Donaldson K. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel after intratracheal instillation. *J. Occup. Health*. 2003; 45: 23-30.

REFERENCES:

- Katsnelson B.A. Combined action of chemicals. In: Kuryandskij BA, Filov VA (eds.). Moscow: «Meditsina» Publishers, 2002: 497-520 (in Russian).
- Varaksin A.N., Katsnelson B.A., Panov V.G., Privalova L.I., Kireyeva E.P., Valamina I.E., Beresneva O.Yu. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead. *Food Chem. Toxicol.* 2014; 64: 144-156.
- Keane M., Stone S., Chen B. Welding fumes from stainless steel gas metal arc processes contain multiple manganese chemical species. *J. Environ. Monit.* 2010; 12: 1130-1140.
- Taube F. Manganese in occupational arc welding fumes – aspects on physicochemical properties, with focus on solubility. *Ann. Occup. Hyg.* 2012; 57: 6-25.
- Andujar P., Simon-Deckers A., Galateau-Salle F., Fayard B., Beaune G., Clin B., Billon-Galland M.-A., Duruphy O., Paireon J.-C., Doucet J., et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Part. Fibre Toxicol.* 2014; 11: 23.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., Minigalieva I.A., Kireyeva E.P., Khodos M.Y., Kozitsina A.N., et al. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: Are we defenseless against nanoparticles? *Int. J. Occup. Environ. Health*. 2010; 16: 508-524.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., Minigalieva I.A., Kireyeva E.P., Kozitsina A.N., Malakhova N.A., Glazyrina J.A., et al. Experimental estimates of the toxicity of iron oxide Fe₃O₄ (magnetite) nanoparticles. *Cent. Eur. J. Occup. Environ. Med.* 2010; 16: 47-63.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Makeyev O.H., Shur V.Y., Beikin J.B., Sutunkova M.P., Kireyeva E.P., Minigalieva I.A., Loginova N.V., et al. Comparative *in vivo* assessment of some adverse bio-effects of equidimensional gold and silver nanoparticles and the attenuation of nanosilver's effects with a complex of innocuous bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 2449-2483.
- Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Y., Beikin J.B. et al. Cytological and biochemical characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in rats after intratracheal instillation of nano-scale copper oxide particles. *Toxic. Vestnik*. 2014; 5 (in Russian).
- Gessner P.K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology*. 1995; 105: 161-179.
- Privalova L.I., Katsnelson B.A., Osipenko A.B., Yushkov B.H., Babushkina L.G. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity. *Environm. Health Perspect.* 1980; 35: 205-218.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I. Recruitment of phagocytizing cells into the respiratory tract as a response to the cytotoxic action of deposited particles. *Environ. Health Perspect.* 1984; 55: 313-325.
- Gennings C. On testing for drug/chemical interaction: definitions and inference. *J. Biopharm. Stat.* 2000; 10(4): 457-467.
- Katsnelson D.A., Balesin S.L., Davydova V.I., Neisvestnova E.M., Privalova L.I., Konysheva L.I. General patterns, experimental and mathematical methods of assessing combined toxicity of metals. In: «Proceedings of the plenary meetings of executive boards of the All-Union and Armenian Toxicological Societies dedicated to the problem of combined action of chemicals on the organism», Yerevan, 1989: 14-17 (in Russian).
- Donaldson K., Bolton R., Jones E.A., Brown G.M., Robertson M.D., Slight J., Cowie H., Davis J.M.G. Kinetics of the bronchoalveolar leucocyte response in rats during exposure to equal airborne mass concentrations of quartz, chrysotile asbestos, or titanium dioxide. *Thorax*. 1988;43: 525-533.
- Zhang Q., Yukinori K., Sato K., Nakakuki K., Koyahama N., Donaldson K. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. *J. Toxicol. Environ. Health*. 1998; 53: 423-438.
- Zhang Q., Yukinori K., Zhu X., Sato K., Mo Y., Kluz T., Donaldson K. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel after intratracheal instillation. *J. Occup. Health*. 2003; 45: 23-30.

B.A.Katsnelson¹, I.A.Minigalieva¹, L.I. Privalova¹, M.P.Sutunkova¹, V.B. Gurvich¹, V.Ya. Shur², E.V. Shishkina², A.N.Varaksin³, V.G. Panov³

LOWER AIRWAYS RESPONSE IN RATS TO A SINGLE OR COMBINED INTRATRACHEAL INSTILLATION OF MANGANESE AND NICKEL NANOPARTICLES AND ITS ATTENUATION WITH A BIO-PROTECTIVE PRE-TREATMENT

¹ Federal Budgetary Science Institution «Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers», 620014, Ekaterinburg, Russian Federation

² Centre for Shared Use «Modern Nanotechnologies» of the Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russian Federation

³ Institute of Industrial Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 620990, Ekaterinburg, Russian Federation

Nickel(II) oxide and multiple manganese species [manganese(II,III) oxide included], may be jointly present in welding fumes submicron fraction. Using laser ablation of 99.99% pure metallic plates in de-ionized water, suspensions of NiO and Mn₃O₄ nanoparticles with mean ($\pm\sigma$) diameters 30 \pm 12 nm and 32 \pm 10 nm respectively were created. Both suspensions were instilled intratracheally to rats, one immediately after another in alternating sequence or separately (another instillation being with water). The broncho alveolar lavage fluid (BALF) was obtained 24 h after. The increase in total BALF cells, alveolar macrophages (AM) and neutrophil leukocytes (NL) counts and especially in the NL/AM ratio (which is a reliable comparison index of instilled particles cytotoxicity) was significantly higher at exposure to NiO than to Mn₃O₄. Semi-contact atomic force microscopy of cell surface topography demonstrated active endocytosis of NiO and Mn₃O₄ nanoparticles by pulmonary phagocytes. The higher pulmonary cytotoxicity of NiO as compared with Mn₃O₄ nanoparticles was also shown by increase in some lysosomal enzyme activities. Mathematical analysis revealed a sub-additive combined action of NiO and Mn₃O₄ judging by cellular indices, while judging by different biochemical indices additivity, sub-additivity or synergism were shown. In rats fed glutamate, glycine, acetyl cysteine, iodide and a Se-containing multivitamin preparation orally during 4 weeks before exposure to NiO+Mn₃O₄ (0.25 mg each), the latter evoked a significantly weaker NL recruitment than in rats so exposed without pretreatment.

Key words: nanoparticles, nickel oxide, manganese oxide, bronchoalveolar lavage, pulmonary cytotoxicity, combined action, bioprotectors.

Материал поступил в редакцию 28.10.2014 г.