

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Кацнельсон Б.А.¹, Чернышов И.Н.¹, Соловьева С.Н.¹, Минигалиева И.А.¹, Гурвич В.Б.¹, Валамина И.Е.²,
Макеев О.Г.², Сахаутдинова Р.Р.¹, Привалова Л.И.¹, Царегородцева А.Е.², Коротков А.В.², Шуман Е.А.²,
Панов В.Г.^{1,3}, Сутункова М.П.¹

О пороговой концентрации наночастиц оксида никеля при хронической ингаляционной экспозиции крыс

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620014, Екатеринбург, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620109, Екатеринбург, Российская Федерация;

³ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения Российской академии наук, 620990, Екатеринбург, Российская Федерация

Введение. Наночастицы оксида никеля представляют интерес для токсикологической науки не только как производимые для промышленных и научных нужд, но и как спонтанные загрязнители атмосферы и рабочей зоны при промышленных процессах, связанных с металлургией и сваркой.

Материал и методы. Проведено ингаляционное воздействие на крыс в установке типа «только нос» нано-аэрозоля оксида никеля в концентрации $2,4 \pm 0,4$ мкг/м³ при 4-часовых экспозициях по 5 раз в неделю общей продолжительностью от 2 нед до 6 мес.

Результаты. Из нескольких десятков исследованных показателей отмечено лишь несколько статистически значимых проявлений, связанных с реакцией глубоких дыхательных путей на вдыхаемые наночастицы, однако по биохимическим и морфометрическим показателям лёгких даже на самых больших сроках воздействия межгрупповые различия были несущественны. Вместе с тем, уже с первых недель экспозиционного периода обнаруживаются генотоксический и аллергический эффекты этого воздействия.

Выводы. В отношении большинства оценённых эффектов воздействие наночастиц оксида никеля на данных концентрациях может рассматриваться как близкое к пороговому или даже к недействующему уровню. Однако по некоторым показателям отмечаются эффекты, позволяющие предположить беспороговый характер.

Ключевые слова: наночастицы оксида никеля; респираторная и общая токсичность; генотоксичность; аллергенность

Для цитирования: Кацнельсон Б.А., Чернышов И.Н., Соловьева С.Н., Минигалиева И.А., Гурвич В.Б., Валамина И.Е., Макеев О.Г., Сахаутдинова Р.Р., Привалова Л.И., Царегородцева А.Е., Коротков А.В., Шуман Е.А., Панов В.Г., Сутункова М.П. О пороговой концентрации наночастиц оксида никеля при хронической ингаляционной экспозиции крыс. *Токсикологический вестник*. 2021; 29(5): 34-42. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-34-42>

Для корреспонденции: Кацнельсон Борис Александрович, доктор медицинских наук, профессор, научный консультант ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург. E-mail: bkaznelson@ymrc.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование произведено за счёт бюджета ЕМНЦ ПОЗРПП.

Участие авторов: Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Гурвич В.Б., Сутункова М.П. – концепция и дизайн исследования, написание текста; Чернышов И.Н., Соловьева С.Н., Минигалиева И.А. – проведение исследования; Сахаутдинова Р.Р., Валамина И.Е., Макеев О.Г., Царегородцева А.Е., Коротков А.В., Шуман Е.А., Панов В.Г. – сбор и обработка материала. Все соавторы – обсуждение результатов, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Поступила в редакцию 2021 / Принята в печать 20 сентября 2021 / Опубликовано 30 октября 2021

Katsnelson B.A.¹, Chernyshov I.N.¹, Solovyeva S.N.¹, Minigalieva I.A.¹, Gurvich V.B.¹, Valamina I.E.², Makeyev O.G.², Sahautdinova R.R.¹, Privalova L.I.¹, Tsaregorodtseva A.E.², Korotkov A.V.², Shuman E.A.², Panov V.G.^{1,3}, Sutunkova M.P.¹

About the threshold concentration of nickel oxide nanoparticles in long-term inhalation exposure of rats

¹FBRI "The Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers" of Rospotrebnadzor, Yekaterinburg, 620014, Russia;

²The Ural State Medical University; Yekaterinburg, 620109, Russia;

³Institute of Industrial Ecology, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620990, Russia

Introduction. Nickel oxide nanoparticles are of interest for toxicological science, not only as engineered nanoparticles, producing for industrial and scientific needs, but also as spontaneous pollutants of the atmosphere and the working area in industrial processes related to metallurgy and welding.

Materials and methods. Rats were exposed to nickel-oxide aerosol at a concentration of $2.4 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in a "nose only" inhalation setup for 4 hours at a time, 5 times a week, during an overall period of 2 weeks to 6 months.

Results. Of the several dozen examined parameters, only a few statistically significant manifestations associated with the reaction of the deep airways to inhaled nanoparticles were noted. However, in the biochemical and morphometric parameters of the lungs, even at the longest periods of exposure, the intergroup differences were insignificant. At the same time, even from the first weeks of the exposure period, genotoxic and allergic indices shifts are detected.

Conclusion. For most of the evaluated effects, this level of exposure to nickel oxide nanoparticles may be considered as close to LOAEL, or even to NOAEL. However, according to some indicators, there are effects that suggest a non-threshold nature.

Keywords: *nickel oxide nanoparticles; inhalation exposure; pulmonary and systemic toxicity; genotoxicity; allergic sensitization*

For citation: Katsnelson B.A., Chernyshov I.N., Solovyeva S.N., Minigalieva I.A., Gurvich V.B., Valamina I.E., Makeyev O.G., Sahautdinova R.R., Privalova L.I., Tsaregorodtseva A.E., Korotkov A.V., Shuman E.A., Panov V.G., Sutunkova M.P. About the threshold concentration of nickel oxide nanoparticles in long-term inhalation exposure of rats. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2021; 29(5): 34-42. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-34-42> (In Russian)

For correspondence: Boris A. Katsnelson, MD, professor, scientific consultant FBRI YMRC PHPIW of Rospotrebnadzor, 620014, Yekaterinburg, Russia. E-mail: bkaznelson@ymrc.ru

Information about the authors:

Katsnelson B.A., <https://orcid.org/0000-0001-8750-9624>
Solovyeva S.N., <https://orcid.org/0000-0001-8580-403X>
Gurvich V.B., <https://orcid.org/0000-0002-6475-7753>
Makeyev O.G., <https://orcid.org/0000-0001-6819-3185>
Privalova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>
Korotkov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5114-6104>
Panov V.G., <https://orcid.org/0000-0001-6718-3217>

Chernyshov I.N., <https://orcid.org/0000-0002-2018-5386>
Minigalieva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>
Valamina I.E., <https://orcid.org/0000-0001-7387-5287>
Sahautdinova R.R., <https://orcid.org/0000-0002-2726-9259>
Tsaregorodtseva A.E., <https://orcid.org/0000-0001-9444-8399>
Shuman E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1981-4330>
Sutunkova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1749-7642>

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

Acknowledgments. Funded by the budget of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers.

Author contribution: Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Sutunkova M.P. – the concept and design of the study, writing the text; Chernyshov I.N., Solovyeva S.N., Minigalieva I.A. – conducting experiments; Sahautdinova R.R., Valamina I.E., Makeyev O.G., Tsaregorodtseva A.E., Korotkov A.V., Shuman E.A., Panov V.G. – data obtaining and processing. All co-authors – discussing the draft paper, editing, approval the final version of the article.

Received: 2021 / Accepted: September 20, 2021 / Published: October 30, 2021

Введение

Подобно многим другим наноразмерным металлсодержащим веществам, наночастицы оксида никеля (NiO-НЧ) представляют особый токсикологический интерес потому, что они не только целенаправленно производятся для разнообразного технического и научного применения (так называемые *engineered nanoparticles*), но и образуются спонтанно как загрязнители воздуха при ряде металлургических и сварочных технологий. Не удивительно, что их действие на организм служило предметом большого числа экспериментальных оценок [1–17], проводившихся *in vitro* и реже *in vivo*. Вместе с тем, мы находим в литературе мало публикаций, посвящённых ингаляционным экспериментальным экспозициям к NiO-НЧ, причём продолжительность последних обычно не превышала 4 нед [18–21]. Изучение эффектов хронического ингаляционного воздействия аэрозоля NiO-НЧ было впервые проведено нами [22]. Повторные экспозиции крыс в установке типа «только нос» к NiO-НЧ диаметром 23 ± 5 нм при средней концентрации $0,23 \pm 0,01$ мг/м³ (230 ± 10 мкг/м³) проводились по 4 ч в день 5 раз в неделю при суммарной продолжительности эксперимента до 3, 6 или 10 мес. Реакция организма на это воздействие включала в себя разнообразные проявления системной токсичности с особо выраженным влиянием на функцию печени и почек, окислительно-восстановительный баланс, повреждение некоторых участков мозговой ткани, связанное с трансфером наночастиц со слизистой носа по ольфакторному тракту; некоторые цитологические признаки вероятного развития аллергического синдрома; парадоксально низкую выраженность пульмонарной патологии по пневмокониотическому типу, объяснимую малой хронической задержкой наночастиц в лёгких; генотоксический эффект организменного уровня. Наряду с этим, NiO-НЧ вызывали и относительно специфичную для токсических эффектов никеля фазовую стимуляцию эритропоэза.

В этом исследовании уровень ингаляционной экспозиции крыс, если его рассматривать с позиций экспериментального моделирования человеческой экспозиции в условиях 8-часового рабочего дня, может казаться очень высоким, принимая во внимание, что ПДК соединений никеля, в том числе его оксида, в воздухе рабочей зоны установлена в

России на уровне 0,05 мг/м³ по Ni, то есть в 3,6 раза ниже. Не следует упускать из виду, что лимитирующим критерием вредности при установлении этой ПДК являлась не столько токсичность, сколько канцерогенность никеля и всех его соединений.

Ещё ниже единственный законодательно установленный в США норматив референтного уровня ингаляционной экспозиции (REL – referent exposure level) к оксиду никеля, обязательный только в штате Калифорния, а именно 0,06 мкг Ni/м³ (обоснован экспериментами на мышах, причём в качестве критического органа рассматривалась только дыхательная система). Вместе с тем, сходные по назначению параметры допустимой концентрации оксида никеля в воздухе при 8-часовой экспозиции, установленные другими американскими агентствами, гораздо выше: ACGIH TLV – 0,2 мг (т.е. 200 мкг) Ni/м³ (ингалябельная фракция); OSHA PEL (permissible exposure level) – 1 мг (т.е. 1000 мкг) Ni/м³. При этом ни в одном из перечисленных регламентов не оговорено, относятся ли они также к никельсодержащим *наночастицам*, в частности, к NiO-НЧ.

Поэтому сохраняет актуальность поиск в хроническом ингаляционном эксперименте с NiO-НЧ (который оценивал бы не только их респираторную, но и многовекторную системную токсичность) той концентрации этого вещества в воздухе, которая могла бы служить отправной точкой для обоснования гигиенических параметров его допустимого содержания в воздухе рабочей зоны. Этой отправной точкой в России является так называемая «пороговая» концентрация при хронической экспозиции (Lim_{ch}), а во многих странах мира – близкий по смыслу параметр LOAEL (lowest observed adverse effect level), то есть «наименьший уровень воздействия, на котором может быть замечен его неблагоприятный эффект». Хотя эти параметры и не являются однозначными и статистически строгими, их даже ориентировочная оценка – важнейший этап указанного обоснования стандартов безопасности. Наряду с этим, используется и нахождение в эксперименте не действующей концентрации, или так называемого NOAEL (no observed adverse effect level), статистическая неопределённость которого столь же несомненна.

Учитывая результаты вышеупомянутого исследования [22], с целью оценки порога хронического токсического действия повтор-

ных ингаляций того же аэрозоля NiO-NЧ мы провели новый эксперимент, аналогичный по дизайну, но при сниженной на 2 порядка концентрации, а именно $0,0024 \pm 0,0004$ мг/м³ ($2,4 \pm 0,4$ мкг/м³) по общей массе частиц.

Материал и методы

Витающие NiO-NЧ, полученные с помощью искрового разряда между стержнями 99,99 % химически чистого никеля в атмосфере азота, окислялись в воздушном потоке и подавались в автоматически управляемую многоярусную ингаляционную установку («башню») типа «только нос» на 60 крыс, помещаемых в индивидуальные иммобилизующие пеналы (CH Technologies. Westwood. NJ. USA). Аналогичная «башня» использовалась для параллельной ложной экспозиции контрольных крыс. Ингаляционную экспозицию проводили 5 раз в неделю по 4 ч в день в течение 2 или 6 нед, 3 или 6 мес в концентрации $2,4 \pm 0,4$ мкг/м³, которую измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Химическая идентичность НЧ, отобранных на поликарбонатные фильтры, была подтверждена с помощью Рамановской спектроскопии. Средний размер частиц, оценённый путем подсчёта частиц разного диаметра при сканирующей электронной микроскопии фильтров, составлял 23 ± 5 нм. Эксперименты были проведены на аутбредных крысах-самках из собственной колонии при начальной массе тела 150–220 г. в возрасте 3–4 мес. Каждая экспонированная или контрольная группа включала не менее 12 особей. Крысы содержались в специальном помещении, отделённом от остальных помещений вивария, и получали чистую бутилированную воду и стандартный сбалансированный корм, хранящийся отдельно от общих запасов.

После завершения периода экспозиций проводились следующие исследования: взвешивание; бронхо-альвеолярный лаваж для цитологической и биохимической характеристики получаемой при нём жидкости (БАЛЖ), оценка суммационно-порогового показателя активности безусловных защитных рефлексов (СПП); регистрация двигательной активности и исследовательского поведения по числу пересекаемых квадратов и заглядываний в «норки»; сбор мочи на протяжении 24 ч для измерения диуреза, содержания в ней креатинина, копропорфирина, общего белка, мочевой кислоты и мочевины.

Затем крыс умерщвляли быстрой перерезкой шейных сосудов, собирали кровь, вскрывали полости для извлечения и взвешивания внутренних органов. Биохимические показатели, определяемые в крови, включали общий белок, альбумин, глобулины, билирубин, церулоплазмин, восстановленный глутатион, малоновый диальдегид, лактатдегидрогеназу, щелочную фосфатазу, аланин- и аспартат-аминотрансферазы, каталазу, гамма-глутаминтрансферазу, креатинин. С помощью автоматического гематологического анализатора МУТНІС-18 определяли гемоглобин, гематокрит, эритроциты, средний объём эритроцитов, ширину распределения эритроцитов, тромбоциты, лейкоциты, лейкоцитарную формулу. Ретикулоциты подсчитывали рутинным способом. Проводилось цитохимическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови, основанное на восстановлении пара-нитротетразолия фиолетового до формазана и подсчёте гранул последнего при оптической микроскопии с иммерсией.

Лёгкие, печень, селезёнка, почки и головной мозг от 4 крыс каждой группы, умерщвлённых после 3 и 6 мес экспозиции, исследовались гистологически. Для оценки аллергической сенсibilизации организма к никелю по 0,1 мл крови добавляли в две центрифужные пробирки, содержащие: 1-я группа (опытная) – 0,05 мл физиологического раствора, в котором растворена рабочая доза аллергена (2 мкл); 2-я группа (контрольная) – 0,05 мл физиологического раствора без аллергена. Обе пробирки инкубировались в течение двух часов при 37 °С. Затем для разрушения эритроцитов по 0,02 мл пробы переносили соответственно в две пробирки, содержащие по 0,4 мл 3-процентного водного раствора уксусной кислоты. Подсчет абсолютного количества лейкоцитов проводили в счётной камере крови Горяева.

Для определения специфических иммуноглобулинов Ig E исследуемая сыворотка крови экспонированной или контрольной крысы предварительно инкубируется при 37 °С в течение 60 мин. Рабочее разведение химического аллергена в физиологическом растворе составляет 4 % (25-кратное разведение). Соотношение исследуемой сыворотки и разведённого химического аллергена при постановке ИФА составляет 1:1.

Генотоксический эффект интоксикации на организменном уровне оценивался по

Таблица 1 / Table 1

Численность клеток в БАЛЖ, полученная через 24 ч после завершающего ингаляционного воздействия аэрозоля NiO-НЧ в концентрации $2,4 \pm 0,4$ мкг/м³ ($x \pm s.e.$)
Number of cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) obtained 24 h after the last inhalation exposure to nickel-oxide nanoparticles (NiO-NP) at 2.4 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($x \pm s.e.$)

Продолжительность эксперимента	Группа животных	Численность клеток, $\times 10^6$			Отношение НЛ / АМ
		общая клеточность	нейтрофилы	альвеолярные макрофаги	
2 нед	NiO-НЧ	$3,03 \pm 0,28^*$	$0,67 \pm 0,14^*$	$2,36 \pm 0,26^*$	$0,33 \pm 0,08$
	Контроль	$1,75 \pm 0,11$	$0,22 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,11$	$0,16 \pm 0,06$
4 нед	NiO-НЧ	$3,37 \pm 0,41^*$	$0,92 \pm 0,28^*$	$2,44 \pm 0,28^*$	$0,41 \pm 0,13$
	Контроль	$1,67 \pm 0,28$	$0,28 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,25$	$0,28 \pm 0,13$
3 мес	NiO-НЧ	$5,04 \pm 0,63$	$0,66 \pm 0,17^*$	$4,36 \pm 0,52$	$0,15 \pm 0,03^*$
	Контроль	$4,38 \pm 0,56$	$0,19 \pm 0,04$	$4,18 \pm 0,53$	$0,05 \pm 0,01$
6 мес	NiO-НЧ	$4,86 \pm 0,98$	$0,85 \pm 0,19^*$	$4,01 \pm 0,85$	$0,23 \pm 0,06^*$
	Контроль	$3,39 \pm 0,66$	$0,22 \pm 0,05$	$3,18 \pm 0,62$	$0,07 \pm 0,01$

Примечание. * – статистически значимое отличие от контроля ($p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента).

степени фрагментации ДНК в ядродержащих клетках крови в ПДАФ-тесте.

Статистическая значимость межгрупповых различий средних значений всех величин оценивалась с помощью t -критерия Стьюдента с внесением поправки Бонферрони для множественных сравнений.

Результаты и обсуждение

Пульмотоксичность. Как видно из табл. 1, сдвиги цитологической характеристики БАЛЖ через 24 ч после ингаляции, завершающей каждый заданный период экспозиции, по сравнению с соответствующими контрольными величинами были, хотя и не всегда статистически значимыми, но по знаку обычными для фагоцитарной реакции на отложение цитотоксичных частиц в глубоких дыхательных путях: повышение общей клеточности за счёт мобилизации как альвеолярных макрофагов (АМ), так и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) при повышенном отношении НЛ/АМ. Особо отметим, однако, что в целом эти сдвиги были менее выражены, чем в аналогичном эксперименте, проведённом при значительно более высокой концентрации тех же наночастиц [22].

Принимая, что эти сдвиги в каждый срок определяются в основном защитной реакцией лёгких на действие последней порции отложившихся в них частиц, не удивительно, что мы не видим нарастания этих сдвигов с удлинением суммарного срока экспозиции.

Между тем, если бы нейтрофильная популяция БАЛЖ отражала не столько дозозависимое функционирование физиологических механизмов лёгочного клиренса [23–24], сколько развитие воспалительного процесса в глубоких дыхательных путях, то следовало бы ожидать её постепенного нарастания.

Об отсутствии хронического воспаления говорит также отсутствие обычных для него однозначных и статистически значимых сдвигов биохимических характеристик БАЛЖ (табл. 2), которые, в частности наблюдались в предыдущем эксперименте с NiO-НЧ [22]. Между тем 6-месячный экспозиционный период соответствует 20% нормальной 2,5-летней продолжительности жизни лабораторной крысы, то есть в масштабах почти 70-летней ожидаемой жизни стандартного человека эквивалентен 14 годам, так что вредную экспозицию вполне можно рассматривать как продолжительную.

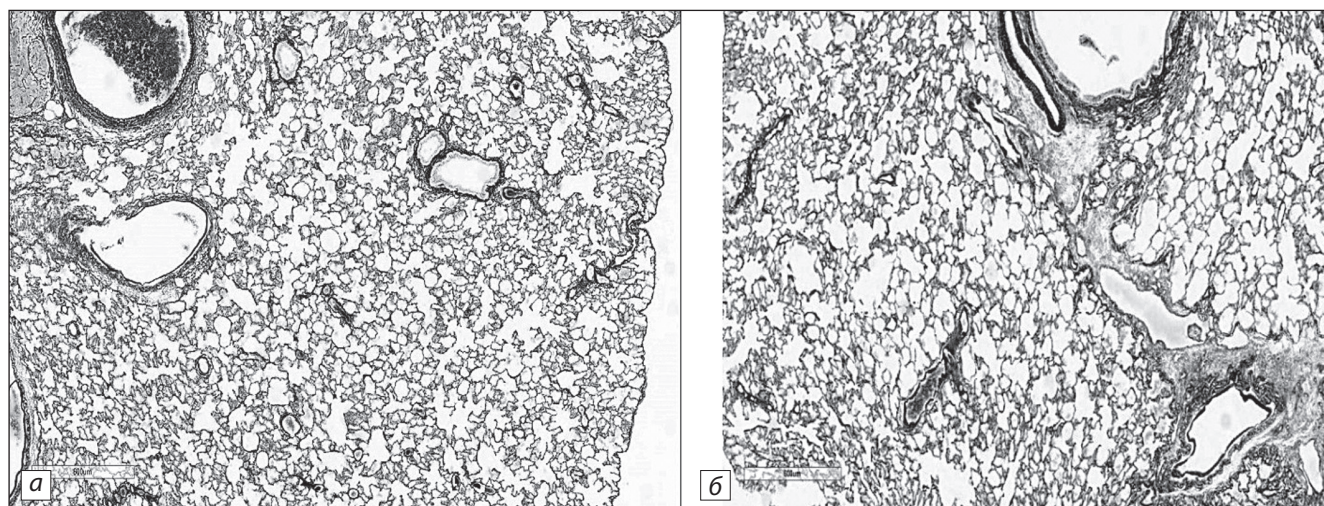
Таким образом, судя по всем рассмотренным характеристикам БАЛЖ, испытанная в нынешнем эксперименте концентрация NiO-НЧ в отношении её повреждающего действия на дыхательные пути является подпороговой. Об этом же говорит отсутствие, вплоть до конца 6-месячного экспозиционного периода, заметных межгрупповых различий по морфологической картине лёгких при гистологическом исследовании (см. рисунок).

Общетоксическое действие. Из нескольких десятков оцененных нами функциональных показателей (см. раздел «Материал

Таблица 2 / Table 2

Содержание некоторых энзимов в БАЛЖ, полученной через 24 ч после завершающего ингаляционного воздействия аэрозоля NiO-НЧ в концентрации $2,4 \pm 0,4$ мкг/м³ ($x \pm s.e.$)
Some biochemical indices in the BALF supernatant obtained 24 h after the last inhalation exposure to NiO-NP at 2.4 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($x \pm s.e.$)

Продолжительность эксперимента	Группа крыс	Содержание в супернатанте БАЛЖ					
		щелочной фосфатазы, Е/л	аспартам-аминотрансферазы, Е/л	аланин-амино-трансферазы, Е/л	амилазы, Е/л	гамма-глутамил-транспептидазы, Е/л	лактатдегидрогеназы, Е/л
2 нед	Контроль	43,32 ± 7,18	6,48 ± 1,16	0,67 ± 0,18	6,32 ± 1,34	1,87 ± 0,40	35,11 ± 6,10
	NiO-НЧ	54,89 ± 3,24	7,25 ± 1,29	1,75 ± 0,95	6,25 ± 1,81	2,24 ± 0,55	67,75 ± 17,59
4 нед	Контроль	57,05 ± 4,04	5,03 ± 0,68	2,09 ± 0,54	3,34 ± 0,24	1,33 ± 0,31	35,50 ± 4,27
	NiO-НЧ	45,07 ± 8,58	4,40 ± 1,22	2,31 ± 0,36	2,87 ± 0,46	1,23 ± 0,25	31,57 ± 6,22
3 мес	Контроль	18,81 ± 6,54	4,29 ± 0,88	0,66 ± 0,29	1,89 ± 0,27	1,47 ± 0,53	25,86 ± 8,37
	NiO-НЧ	13,19 ± 2,92	5,84 ± 1,46	0,31 ± 0,14	1,90 ± 0,35	1,23 ± 0,39	19,57 ± 8,05
6 мес	Контроль	17,11 ± 3,79	5,77 ± 0,74	0,27 ± 0,14	2,47 ± 0,44	1,91 ± 0,50	27,86 ± 5,78
	NiO-НЧ	17,67 ± 2,13	4,96 ± 0,52	0,27 ± 0,26	2,10 ± 0,21	2,23 ± 0,22	33,86 ± 5,47



Микрофотографии срезов крысиных лёгких: а – после 6-месячной экспозиции к NiO-НЧ; б – в соответствующей контрольной группе. Импрегнация серебром по Гомори. Увеличение $\times 600$.

Micrographs of the rat's lungs: а – after repeated 6-month exposure to NiO-NP's; б – in the control group of same exposure period. Gomori's silver impregnation. Magnification $\times 600$.

и методы») только по четырем (не считая коэффициента фрагментации ДНК ядросодержащих клеток крови и некоторых признаков аллергической сенсibilизации), отличие от соответствующего контроля было статистически значимым (табл. 3), При этом значимое снижение массы головного мозга, почек и клиренса эндогенного креатинина отмечены только к концу 6-месячного экспозиционного периода.

Более стабильным оказалось обнаруженное уже после двухнедельной экспозиции и нарастающее с её удлинением повышение доли ретикулоцитов, при том что ни один дру-

гой гематологический индекс не был изменён вплоть до конца эксперимента¹, Отметим однако, что реакция крови на стократно более высокий уровень экспозиции к NiO-НЧ [22] имела тот же парадоксальный характер, а общее число статистически значимых сдвигов к концу периода экспозиции было примерно тем же (всего шесть, опять-таки не считая вышеупомянутых исключений).

В той же табл. 3 показано относительно небольшое, но статистически значимое

¹ Довольно противоречивые литературные данные о влиянии никелевых интоксикаций на красную кровь были приведены нами в предыдущей публикации [22].

Некоторые показатели состояния организма крыс после воздействия аэрозоля NiO-NЧ в концентрации $2,4 \pm 0,4$ мкг/м³ ($x \pm s.e.$)

Some indices of rat organism's status after repeated inhalation of nickel-oxide nanoparticles at 2.4 ± 0.4 µg/m³ ($x \pm s.e.$)

Показатель	Продолжительность эксперимента							
	2 недели		4 недели		3 месяца		6 месяцев	
	Группа крыс							
	Контроль	NiO-NЧ	Контроль	NiO-NЧ	Контроль	NiO-NЧ	Контроль	NiO-NЧ
Масса головного мозга, г	1,91 ± 0,04	1,94 ± 0,03	1,96 ± 0,06	1,86 ± 0,06	2,03 ± 0,03	1,95 ± 0,03	2,07 ± 0,05	1,89 ± 0,06*
Масса почек, г	1,43 ± 0,03	1,37 ± 0,07	1,56 ± 0,03	1,47 ± 0,05	1,91 ± 0,09	1,76 ± 0,06	2,15 ± 0,06	1,95 ± 0,06*
Ретикулоциты, ‰	5,10 ± 0,64	7,10 ± 0,46*	7,67 ± 1,41	11,67 ± 1,67	Нет данных	Нет данных	6,17 ± 0,31	16,14 ± 1,40*
Клиренс эндогенного креатинина	0,72 ± 0,06	0,68 ± 0,06	0,49 ± 0,07	0,42 ± 0,04	0,58 ± 0,11	0,72 ± 0,06	0,87 ± 0,06	0,55 ± 0,11*
Коэффициент фрагментации геномной ДНК клеток крови	0,4235±0,0032	0,4477±0,0041*	0,4223±0,0019	0,4489±0,0003*	0,4225±0,0013	0,4535±0,029*	0,4223±0,0015	0,4623±0,013*
Реакция специфического лизиса лейкоцитов, %	6,12 ± 1,27	8,32 ± 1,88	4,10 ± 1,06	12,96 ± 1,37*	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Ni-специфичный IgE	1,05 ± 0,09	1,22 ± 0,13	0,94 ± 0,16	1,18 ± 0,14	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Эозинофилы в тканевых отпечатках селезёнки, %	4,57 ± 0,65	8,29 ± 1,57*	5,00 ± 0,37	7,50 ± 1,18	3,22 ± 0,84	5,10 ± 1,28	3,19 ± 0,81	5,33 ± 1,48

Примечание. * – статистически значимое отличие от контроля ($p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони).

повышение коэффициента фрагментации геномной ДНК в ядросодержащих клетках циркулирующей крови, которое наблюдалось уже после 2-недельной экспозиции, когда доза никеля, задержанная в организме, могла быть лишь ничтожно малой. Нельзя не отметить, что если в контрольной группе крыс этот показатель был практически стабилен на протяжении всего 6-месячного периода, то в экспонированной он в небольшой степени, но однонаправлено возрастал от срока к сроку, возможно, что это связано с постепенным увеличением накопленной внутренней дозы никеля². Только к концу периода коэффициент фрагментации ДНК был несколько ниже, чем к соответствующему сроку предыдущего эксперимента [22] с более высокой концен-

² К сожалению, по техническим причинам мы не смогли определить содержание Ni в тканях и крови крыс в этом эксперименте, но в предыдущем [22] оно было увеличено очень незначительно, даже при более высоком уровне экспозиции.

трацией тех же наночастиц ($0,5332 \pm 0,0031$) и при сходном с нынешним контрольным показателем ($0,4247 \pm 0,0006$).

Эти результаты согласуются с распространёнными в науке представлениями о дозозависимом, однако беспороговом характере рисков генотоксического (и связанного с ним канцерогенного) действия токсикантов. С этой точки зрения концепция пороговости (соответственно LOAEL/NOAEL) вообще не применима к данным эффектам, а предлагаемые на основе этой концепции национальные или международные стандарты безопасности лишь корректируются в зависимости от общей политики соответствующих государств в отношении допустимости или недопустимости тех или иных уровней канцерогенного риска.

Ещё сложнее решить вопрос об использовании в целях установления гигиенических стандартов безопасности тех ранних проявлений сенсibilизации организма экспонированных

крыс к никелю, которые также найдены в нашем эксперименте (см. табл. 3). Об аллергической реакции организма на ингаляционную экспозицию к NiO-НЧ разных сроков может дополнительно свидетельствовать также увеличение процента эозинофилов в клеточном составе тканевых отпечатков селезёнки. Отметим, что при более высоком уровне экспозиции этот сдвиг был более выражен, причём не только в селезёнке, но и в печени [22].

Возможность беспорогового характера аллергических ответов на токсические экспозиции не обсуждается в литературе столь же широко, как в отношении действия генотоксичных канцерогенов, однако на такую возможность косвенно указывает тот общеизвестный факт, что сенсibilизация у человека может развиваться и при действии очень низких доз аллергенов (в частности никеля). Это опять снижает определённую концепцию пороговости (LOAEL/NOAEL), но не препятствует её использованию для обоснования стандартов безопасности по другим (не аллергическим) эффектам. Так, многие официально установленные в России значения ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны снабжены пометкой, указывающей на возможность аллергических реакций у отдельных субъектов даже при производственных экспозициях, не превышающих допустимого уровня.

Отметим, что согласно данным [13], рано развивающаяся эозинофильная реакция лёгких крысы на интратрахеальную инстилляцию NiO-НЧ может быть связана не с сенсibilизацией организма к никелю, а с релизом внутриклеточного токсина под прямым триггерным влиянием этих наночастиц. Однако в обсуждаемом ингаляционном эксперименте мы такой реакции по отпечаткам лёгких не видим.

При ранее описанном нами [22] хроническом ингаляционном воздействии NiO-НЧ в более высокой концентрации, как и при субхронических интраперитонеальных интоксикациях различными метало-наночастицами (например, [1], [2]) наблюдались заметные гистопатологические изменения в печени, почках, селезёнке, головном мозге и соответствующие статистически значимые сдвиги некоторых морфометрических показателей. Напротив, в нынешнем исследовании общее впечатление от гистологической характеристики перечисленных органов сводилось к тому, что у экспонированных и контрольных крыс даже к концу 6-месячного эксперимента она идентична. Вместе

с тем по небольшому числу морфометрических индексов был отмечен неблагоприятный эффект токсического воздействия. Так, после 3-месячной ингаляции NiO-НЧ в печени был статистически значимо ($p < 0,05$) увеличен процент бинуклеарных гепатоцитов ($4,47 \pm 0,22$ против $2,00 \pm 0,20$ в контроле) и клеток Купфера ($16,89 \pm 0,82$ против $12,06 \pm 0,71$), но после 6-месячной – только последних ($12,94 \pm 0,38$ против $9,89 \pm 0,63$). При этом наиболее важного показателя повреждения печени, а именно повышения процента безъядерных гепатоцитов, часто отмечаемого в других наших экспериментах (в том числе, [22]), в данном случае не было.

Типичное для токсического повреждения почек увеличение того процента длины сечения проксимальных извитых канальцев, в котором наблюдается потеря щёточной каёмки, имело место только после 6-месячной экспозиции ($12,69 \pm 1,83$ против $7,86 \pm 0,96$ в контроле), но увеличения длины участков полной десквамации тубулярного эпителия ($1,68 \pm 0,67$ в опыте против $2,61 \pm 0,66$ в контроле) не было. Ни в один срок не был изменён диаметр гломерул.

При морфометрии гистологических препаратов селезёнки статистически значимое увеличение планиметрического отношения красной пульпы к белой найдено только после 6-месячного экспозиционного периода ($1,55 \pm 0,07$ против $1,26 \pm 0,07$ в контроле, $p < 0,05$), однако после 3-месячного – имело место статистически не значимое снижение этого показателя.

Таким образом, результаты гистологического исследования внутренних органов в целом согласуются с заключением о близости действующей концентрации NiO-НЧ к пороговой (LOAEL) хронической ингаляционной экспозиции.

Выводы

1. В отношении большинства оценённых нами эффектов хронического (общей продолжительностью до 6 мес) ингаляционного воздействия на крыс наночастиц оксида никеля концентрация $2,4 \pm 0,4$ мкг/м³ при 4-часовых экспозициях по 5 раз в неделю может рассматриваться как близкая к пороговой (LOAEL) или даже к недействующей (NOAEL).

2. Вместе с тем уже с первых недель экспозиционного периода обнаруживаются генотоксический и аллергический эффекты этого воздействия, что косвенно свидетельствует об их беспороговом характере.

ЛИТЕРАТУРА
(пп. 1–23 см. В References)

24. Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Алексеева О.Г., Ползик Е.В. *Пневмоконииозы. Патогенез и биологическая профилактика*. Екатеринбург: УрО РАН; 1995.

REFERENCES

- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., Gurvich V.B., Shur V.Y., Shishkina E.V., Makeyev O.H., Valamina I.E., Varaksin A.N., et al. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity *in vivo*. In: *Bioactivity of Engineered Nanoparticles*. Springer: Singapore. 2017: 259–319.
- Sutunkova M.P., Privalova L.I., Minigaliyeva I.A., Gurvich V.B., Panov V.G., Katsnelson B.A. The most important inferences from the Ekaterinburg nanotoxicology team's animal experiments assessing adverse health effects of metallic and metal oxide nanoparticles. *Toxicol. Rep.* 2018; 5: 363–76.
- Ada K., Turk M., Oguztuzun S., Kilic M., Demirel M., Tandogan N., Ersayar E., Latif O. Cytotoxicity and apoptotic effects of nickel oxide nanoparticles in cultured HeLa cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2010; 48: 524–9.
- Capasso L., Camatini M., Gualtieri M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 2014; 226: 28–34.
- Minigalieva I.A., Bushueva T.V., Froehlich E. Are *in vivo* and *in vitro* assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition of data obtained in respective experiments with NiO and Mn3O4 nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.* 2017; 109: 393–404.
- Mahmoud A., Elif G., Gul O. Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Neurochem. Int.* 2017; 108: 7–14.
- Cao Z., Fang Y., Lu Y., Qian F., Ma Q., He M., Pi H., Yu Z., Zhou Z. Exposure to nickel oxide nanoparticles induces pulmonary inflammation through NLRP3 inflammasome activation in rats. *Int. J. Nanomed.* 2016; 11: 3331–46.
- Gong N., Shao K., Li G., Suna Y. Acute and chronic toxicity of nickel oxide nanoparticles to *Daphnia magna*: The influence of algal enrichment. *Nanoimpact* 2016; 3: 104–9.
- De Carli R.F., Chaves D.S., Cardozo T.R., De Souza A., Seeber A., Honatel K.F., Lehmann M., Dihl R.R. Evaluation of the genotoxic properties of nickel oxide nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2018; 836: 47–53.
- Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., Oyabu T., Myojo T., Hashiba M. Pulmonary toxicity following an intratracheal instillation of nickel oxide nanoparticle agglomerates. *J. Occup. Health* 2011; 53: 293–5.
- 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.
- Katsnelson B.A., Minigalieva I.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Shur V.Y., Shishkina E.V., Varaksin A.N., Panov V.G. 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. *Toxicol. Rev.* 2014; 6: 8–14.
- Lee S., Hwang S.-H., You J.J., Kim S.-H., Lee D.-K., Lee H.-S., Chung S.-T., Jeong Lee S., Jeong J., Roh Ch., Huh Y.S., Cho W.-S. Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin. *Part Fibre Toxicol.* 2016; 13: 30.
- Chang X.H., Zhu A., Liu F.F., Zou L.Y., Su L., Liu S.K., Zhou H.H., Sun Y.Y., Han A.J., Sun Y.F., et al. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary fibrosis via TGF-1 activation in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2017; 36: 802–12.
- Zhu A., Chang X., Sun Y., Zou L., Su L., Li S., Liu S., Zhou H., et al. Role of Oxidative Stress and Inflammatory Response in Subchronic Pulmonary Toxicity Induced by Nano Nickel Oxide in Rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2017; 1: 1753–61.
- Senoh H., Kano H., Suzuki M., Ohnishi M., Kondo H., Takanobu K., Umeda Y., Aiso S., Fukushima S. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *J. Occup. Health* 2017; 59: 112–21.
- Dumala N., Mangalampalli B., Chinde S., Kumari S., Mahoob M., Rahman M., Grover P. Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutagenesis* 2017; 32: 417–27.
- Ogami M., Morimoto Y., Murakami M., Myojo T., Oyabu T., Tanaka I. Biological effects of nano-nickel in rat lungs after administration by inhalation and by intratracheal instillation. *J. Phys. Conf. Ser.* 2009; 151: 012032
- Oyabu T., Myojo T., Lee B.-W., Okada T., Izumi H., Yoshiura Y., Tomonaga T., Li Y.-S., Kawai K., Shimada M., et al. Biopersistence of NiO and TiO2 Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Inhalation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 2757.
- Oyabu T., Ogami A., Morimoto Y., Shimada M., Lenggoro W., Okuyama K., Tanaka I. Biopersistence of inhaled nickel oxide nanoparticles in rat lung. *Inhal. Toxicol.* 2007; 19: 55–8.
- Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Zvezdin V.N., Dovbysh A.A., Ulanova T.S., Smirnov S.A., Stepankov M.S. Comparative assessment of the effects of short-term inhalation exposure to Nickel oxide nanoparticles and microdispersed Nickel oxide. *Nanotechnologies* 2016; 11: 671–7.
- Sutunkova M.P., Solovyeva S.N., Minigalieva I.A., et al. Toxic Effects of Low-Level Long-Term Inhalation Exposures of Rats to Nickel Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019; 20: 1778.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yermenko O.S. 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: 508–24.
- Katsnelson B.A., Privalova L.I., Alexeyeva O.G., Polzik E.V. *Pneumoconiosis: Pathogenesis and Biological Prophylaxis (Pneumoconiosis: Patogenez i biologicheskaya profilaktika)*. Ekaterinburg: Uro RAN; 1995. (in Russian)

ОБ АВТОРАХ:

Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich), доктор медицинских наук, профессор, научный консультант ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: bkaznelson@ymrc.ru

Чернышов Иван Николаевич (Chernyshov Ivan Nikolaevich), младший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: chernishov@ymrc.ru

Соловьева Светлана Николаевна (Solovyeva Svetlana Nikolaevna), заведующая клиникой экспериментальных животных ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: solovyevasn@ymrc.ru

Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna), доктор биологических наук, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики, заведующий лабораторией промышленной токсикологии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: ilzira-minigalieva@yandex.ru

Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich), доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: gurvich@ymrc.ru

Валамина Ирина Евгеньевна (Valamina Irene Evgenevna), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: ivalamina@mail.ru

Макеев Олег Германович (Makeyev Oleg Hermanovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией технологий клеточной и генной терапии Института медицинских клеточных технологий, ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: ootmt305@mail.ru

Сахаутдинова Рената Рашидовна (Sakhautdinova Renata Rashidovna), кандидат медицинских наук, заведующий диагностическим лабораторным отделением НПО «Диагностических лабораторных технологий» ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: sahautdinova@ymrc.ru

Привалова Лариса Ивановна (Privalova Larisa Ivanovna), доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: privalovalia@yahoo.com

Царегородцева Анастасия Евгеньевна (Tsaregorodtseva Anastasia Evgenevna), младший научный сотрудник лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: aisha12_95@mail.ru

Коротков Артем Владимирович (Kortkov Artem Vladimirovich), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории технологий клеточной и генной терапии Института медицинских клеточных технологий, ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: ootmt305@mail.ru

Шуман Евгений Александрович (Shuman Evgeny Alexandrovich), младший научный сотрудник лаборатории технологий клеточной и генной терапии Института медицинских клеточных технологий, ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: ootmt305@mail.ru

Панов Владимир Григорьевич (Panov Vladimir Grigorievich), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: vrpanov@esko.uran.ru

Сутункова Марина Петровна (Sutunkova Marina Petrovna), доктор медицинских наук, директор ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург, Российская Федерация. E-mail: sutunkova@ymrc.ru