

Здоровье населения

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Землянова М.А.^{1,3,4}, Зайцева Н.В.^{1,2}, Игнатова А.М.^{1,4}, Степанков М.С.^{1,3}

ОЦЕНКА РЕАКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ОДНОКРАТНОЕ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНО- И МИКРОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь;²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера», 614000, Пермь;³ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, Пермь;⁴ФГБОУ ВО «Пермский Национальный Исследовательский Политехнический Университет», 614990, Пермь

Введение. Широкое распространение наноматериалов в науке и различных отраслях промышленности обуславливает актуальность гигиенических исследований, направленных на оценку воздействия ультрадисперсных частиц, обладающих канцерогенными свойствами, на организм человека.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на половозрелых крысах-самцах линии Wistar ($n = 27$, по 9 особей в каждой группе), которых подвергали однократной интратрахеальной экспозиции суспензиями наноразмерного и микроразмерного оксида алюминия в концентрации действующего вещества $80,0 \pm 0,09$ мг/мл. Контрольной группе животных вводили чистую основу суспензии (стерильный изотонический физиологический раствор). Для количественной характеристики клеточной реакции дыхательных путей использовали цифровые изображения оптической иммерсионной микроскопии мазков, полученные на поляризационном микроскопе.

Результаты. Цитологическая оценка бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) *in vitro* показала, что при воздействии наночастиц оксида алюминия развивается клеточная реакция по эозинофильному типу, а при воздействии микрочастиц оксида алюминия – по нейтрофильному типу. На основании предложенной модели зависимости количества эозинофилов и нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) в БАЛ от площади поверхности частиц оксида алюминия установлена триггерная величина, превышение которой характеризуется эозинофильной реакцией, а снижение – лимфоцитарной реакцией. Показано, что воздействие нано- и микроразмерных частиц оксида алюминия приводит к повреждению поверхности альвеолярных макрофагов (АМ), степень выраженности которого зависит от удельной площади поверхности частиц. Полученные данные расширяют теоретические знания в области нанотоксикологии и позволяют разрабатывать этиопатогенетически обоснованные профилактические мероприятия для работников в сфере производства наноматериалов и населения, подвергающегося воздействию наноразмерных частиц оксида алюминия.

Обсуждение. Обобщение результатов показало, что степень токсического воздействия частиц оксида алюминия зависит от их дисперсности. Следствием этого может являться увеличение их токсических свойств, характеризующих качественные и количественные цитологические изменения в биологических субстратах, в том числе в БАЛ.

Выводы. Однократное интратрахеальное введение крысам линии Wistar водной суспензии оксида алюминия вызывает клеточную реакцию со стороны дыхательных путей и повреждение альвеолярных макрофагов (АМ). Характер и степень выраженности изменений зависят от общей удельной площади поверхности воздействующих частиц.

Ключевые слова: наночастицы; оксид алюминия; бронхоальвеолярный лаваж; лёгочная цитотоксичность; повреждение альвеолярных макрофагов; анализ изображений.

Для цитирования: Землянова М.А., Зайцева Н.В., Игнатова А.М., Степанков М.С. Оценка реакции дыхательных путей на однократное интратрахеальное введение нано- и микроразмерных частиц оксида алюминия. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(2): 196-202. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-2-196-202>

Для корреспонденции: Землянова Марина Александровна, доктор мед. наук, проф., 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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования в соответствии с государственным заданием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.10.2018

Принята к печати 06.02.2019

Zemlyanova M.A.^{1,3,4}, Zaitseva N.V.^{1,2}, Ignatova A.M.^{1,4}, Stepankov M.S.^{1,3}

ESTIMATION OF THE RESPONSE OF RESPIRATORY TRACTS TO A SINGLE INTRA-TRACHEAL INTRODUCTION OF NANO- AND MICRO-SIZED PARTICLES OF ALUMINUM OXIDE

¹Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation;²E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, 614000, Russian Federation;³Perm State University, Perm, 614990, Russian Federation;⁴Perm National Research Polytechnic University, Perm, 614990, Russian Federation

Introduction. Nanomaterials are now widely used in science and in various industries; in relation to that, it is truly vital to perform hygienic research to assess exposure to ultra-disperse particles with carcinogenic effects on a human body as such research can help to solve tasks in the preventive medicine sphere.

Data and methods. The experiment was performed on 27 pubescent male Wistar rats (9 animals in each group); the animals were exposed to a single intra-tracheal introduction of suspensions that contained nano-sized and micro-sized aluminum oxide in concentrations of 80.0 ± 0.09 mg/ml. The reference group was exposed to a pure suspension (sterile isotonic saline). To quantitatively assess cellular responses in the respiratory tracts, the authors examined digital images of smears obtained via optical immersion microscopy with a polarizing microscope.

Results. Cytological assessment of bronchi-alveolar lavage *in vitro* revealed exposure to nano-particles of aluminum oxide to lead to a cellular response as of eosinophilic type; exposure to micro-particles of aluminum oxide, as of neutrophilic type. The authors proposed a model that described a relationship between a number of eosinophils and neutrophilic leucocytes in bronchi-alveolar lavage and a surface area of aluminum oxide particles; basing on the model, they detected a trigger value; when obtained values are higher than it eosinophilic responses occurs, and when they are lower, a lymphocytic one. The authors also showed that exposure to nano- and micro-sized particles of aluminum oxide resulted in damage to alveolar macrophages surface; the degree of the damage depended on a specific surface area of particles. The obtained data enrich theoretical knowledge accumulated in nanotoxicology and allow to develop etiologically and pathogenetically grounded preventive activities for workers employed at nanomaterials productions and for people who consume products containing nano-sized particles of aluminum oxide.

Discussion. The authors performed the comparative assessment of responses that occurred in the respiratory tracts of Wistar rats as a response to a single intra-tracheal introduction of micro- and nano-sized particles of aluminum oxide; the assessment results were then summarized and their generalization revealed toxic effects to be produced by the particles depended on their dispersity. The obtained data are well in line with an opinion expressed by some authors that a dispersity factor tends to grow as particles become smaller in their size. Another outcome here could be their greater toxic properties that cause various qualitative and quantitative cytological changes in biological substrates, including bronchi-alveolar lavage.

Conclusions. A single intra-tracheal introduction of a water suspension containing aluminum oxide into Wistar rats causes cellular responses in the respiratory tracts and damage to alveolar macrophages. Character and intensity of detected changes depend on the total specific surface area of effecting particles.

Key words: nanoparticles, aluminum oxide, bronchi-alveolar lavage, lung cytotoxicity.

For citation: Zemlyanova M.A., Zaitseva N.V., Ignatova A.M., Stepankov M.S. Estimation of the response of respiratory tracts to a single intra-tracheal introduction of nano- and micro-sized particles of aluminum oxide. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(2): 196-202. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-2-196-202>

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

Information about the author:

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

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received: October 3, 2018

Accepted: February 6, 2019

Введение

В связи с широким распространением наноматериалов в науке и технике, химической, пищевой и медицинской отраслях промышленности особую актуальность для решения задач профилактической медицины приобретают гигиенические исследования, направленные на оценку воздействия ультрадисперсных частиц, в том числе оксидов металлов, обладающих канцерогенными свойствами, на организм человека [1–5]. Многие исследователи отмечают [6–11], что для ряда металлов характерно образование оксидов, обладающих большей потенциальной токсичностью, чем исходное вещество. Токсичность вещества во многом зависит от его стабильности, реакционной и каталитической активности, которые, в свою очередь, зависят от дисперсности частиц вещества [12, 13]. Известно, что с уменьшением размера частицы соотношение площади её поверхности к объёму увеличивается, что приводит к увеличению её каталитической и адсорбционной способности [14–17]. В результате частицы одинакового состава, но разной дисперсности, обладают различной потенциальной токсичностью. Примером тому служит алюминий, который не является признанным канцерогеном, однако Международное агентство по изучению рака (МАИР-IARC) определило производство алюминия как канцерогенное для человека [18] в связи с образованием ультра- и тонкодисперсных частиц оксида алюминия.

В ряде стран Западной Европы (в Норвегии, Германии и Швейцарии) существуют ограничения на произ-

водственные процессы, реализация которых предполагает образование или использование дисперсных материалов с входящими в состав нано- и микроразмерными частицами оксида алюминия [10]. В то же время частицы различной размерности оксида алюминия являются необходимым компонентом матриц, используемых при производстве широкого спектра продукции. Эти частицы входят в состав фармацевтических препаратов, пищевых добавок (консервантов, наполнителей, красителей, эмульгаторов, порошков для выпечки), детского питания, косметических средств, абразивов, огнеупоров, керамики, электрических изоляторов, катализаторов, бумаги, свечей зажигания, лампочек, искусственных камней, стеклообразных и жаропрочных изоляционных волокон [8, 9].

Наноразмерные частицы оксида алюминия за счёт склонности к агрегации в реальных условиях присутствуют как в форме отдельных частиц, так и в форме кластеров и микроразмерных скоплений. Распространённость частиц оксида алюминия различного размера в окружающей среде и в составе промышленной продукции обуславливает актуальность сравнительных исследований токсичности нано- и микроразмерных частиц оксида алюминия для разработки эффективных мер профилактики в связи с существующей опасностью экспозиции работающих в ходе производства и населения при потреблении товаров и услуг.

Одним из методов определения токсичности частиц оксидов металлов является цитологическая оценка бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), проводимая *in vitro* [19–21].

Этот метод может быть значительно расширен за счёт использования количественного анализа [22] параметров клеточных компонентов смывов, их формы, размеров и состояния поверхности. Наиболее объективно и полно оценить указанные параметры и визуализировать их можно методом анализа изображений мазков БАЛ, полученных при оптической микроскопии. Преимуществом анализа изображений является высокая степень визуализации, извлечение массива численных параметров клеточных компонентов, пригодных для обработки методами математической статистики.

Целью исследования является оценка реакции дыхательных путей в эксперименте на однократное интратрахеальное введение нано- и микроразмерных частиц оксида алюминия с использованием метода анализа изображений.

Материал и методы

В качестве тестируемых материалов использовали нанодисперсный оксид алюминия с размером частиц 13–20 нм и микродисперсный аналог с размером частиц 10–20 мкм (10 000–20 000 нм) производства Sigma-Aldrich (США).

Определение удельной площади поверхности частиц оксида алюминия проводили по методу Брюнера–Эммета–Теллера (БЭТ) [23], в качестве адсорбата использовали азот (ГОСТ 9293–74). Образец перед измерением сушили на анализаторе влажносте сходимости MS-70 (A&D) при температуре 110°C до постоянной массы. Далее образец взвешивали с точностью до 0,0001 г на аналитических весах, помещали в стерильную пробирку (ИСО 1042–83) и проводили дегазацию в станции подготовки проб «SorbiPrep» при 110°C в течение 30 мин. Геометрическую форму частиц тестируемого вещества определяли по коэффициенту сферичности ($k_{сф}$), характеризующему сходство формы частиц с эквивалентной сферой (при $k_{сф} = 1$ – форма соответствует идеальной сфере, $k_{сф} = 0,1$ – форма, наиболее отдалённая от идеальной сферы, деформированные элементы) [24]. Сведения о геометрической форме использовали при определении величины фактора дисперсности ($f_{дисп}$) частиц, который является совокупной характеристикой дисперсной системы и определяется отношением площади поверхности к объёму частицы [14].

Экспериментальные исследования выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 380–420 г в соответствии с требованиями Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных¹, Международных рекомендаций (этический кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных², Этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». Экспериментальных животных в количестве 27 особей (по 9 особей в группе) подвергали однократной интратрахеальной экспозиции суспензиями наноразмерного (опытная группа) и микроразмерного (группа сравнения) оксида алюминия в объёме 0,4 мл, содержащей вещество в концентрации $80,0 \pm 0,09$ мг/мл. Для предотвращения агломерации частиц перед интратрахеальным введением их суспензии подвергали диспергированию с помощью ультразвукового гомогенизатора марки *Sonicator Q55* в

течение 4 мин с частотой 20 кГц. Контрольная группа в период эксперимента находилась в аналогичных условиях, вместо суспензии с веществом особям данной группы вводили чистую основу суспензии (стерильный физиологический раствор). Введение суспензий животным проводили под эфирным масочным наркозом. Для изучения реакции дыхательных путей в соответствии с Методикой изучения реакции альвеолярного фагоцитоза (РАФ) [25] через 24 ч после введения суспензии всем животным проведено однократное промывание дыхательных путей стерильным изотоническим физиологическим раствором в объёме 10 мл. Полученные промывные воды – БАЛ – центрифугировали в течение 4 мин при 1000 об/мин на лабораторной центрифуге. После центрифугирования надосадочную жидкость декантировали, из клеточного осадка готовили по два мазка на каждую особь (всего 54 мазка). Высушенные препараты фиксировали метиловым спиртом в течение 1 мин и окрашивали азур-эозином по Романовскому в течение 20 мин. Выполнена количественная оценка содержания альвеолярных макрофагов (АМ), нейтрофильных лейкоцитов (НЛ), эозинофилов, отношения НЛ / АМ.

Для количественной характеристики клеточной реакции дыхательных путей использовали цифровые изображения оптической иммерсионной микроскопии мазков, полученные на поляризационном микроскопе. Анализ изображений проводили с использованием универсального программного обеспечения *ImageJ-FiJi*. Степень повреждения макрофагов оценивали как долю повреждений от общей удельной площади их поверхности, вычисляемой по величине среднего размера единичного повреждения и частоты расположения повреждений на поверхности. Оценку статистической значимости различий между групповыми средними показателями проводили методом определения *F*-критерия Фишера ($F_{крит.} = 4,29$) при заданном уровне значимости 0,05 [26].

Результаты

В результате исследований подтверждены физические характеристики тестируемых веществ (размер, форма), указанные производителем. Среднепоперечный размер частиц нанометрового диапазона в 1000 раз меньше микродисперсного аналога. Оценка коэффициента сферичности всей совокупности исследованных частиц показала, что в среднем его величина для нано- и микроразмерного оксида алюминия составляет 0,78, что соответствует геометрической форме – призма [27]. По результатам оценки фактора дисперсности частиц оксида алюминия установлено, что его величина изменяется от 1,62 (размер частиц 20 мкм) до 3251,80 (размер частиц 10 нм). Зависимость величины фактора дисперсности от размера частиц имеет гиперболический характер, при этом критическим размером является величина 52 нм (фактор дисперсности 625,35) и при диаметре частиц меньше этой величины стабильность вещества снижается. Удельная площадь поверхности нанодисперсных частиц оксида алюминия составила $9,392 \text{ м}^2$, что в 167 раз выше удельной площади поверхности частиц микродисперсного аналога ($0,056 \text{ м}^2$). Концентрация наночастиц в суспензии составила $2,4 \cdot 10^{16}$ ед./мл, что в 10^{10} раз выше концентрации микрочастиц в суспензии ($0,95 \cdot 10^6$ ед./мл), при том, что весовая концентрация оксида алюминия в суспензиях одинаковая.

Результаты цитологического анализа мазков БАЛ представлены в таблице.

Анализ полученных результатов показал, что в БАЛ животных опытной группы общее количество клеток достоверно увеличено (цитоз) в 11,9 раза ($p = 0,0001$), в

¹ Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

² Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (разработан и опубликован в 1985 году Советом международных научных организаций).

Цитологическая характеристика мазков БАЛ крыс линии Wistar через 24 ч после однократного интратрахеального введения нано- и микродисперсного оксида алюминия ($F_{\text{крит.}} = 4,29; p < 0,05$)

Клеточные элементы БАЛ	Группа животных								
	контрольная, $n = 9$			сравнения, $n = 9$			опытная, $n = 9$		
		F	p		F	p		F	p
Общее количество клеток, ед. $\cdot 10^6$	$1,85 \pm 0,01^*$	47,26	0,0001	$17,37 \pm 0,05^{**}$	29,70	0,0003	$21,96 \pm 0,07^{\bullet}$	1,59	0,290
Альвеолярные макрофаги, ед. $\cdot 10^6$	$1,18 \pm 0,07^*$	76,68	0,0001	$5,65 \pm 0,10^{**}$	15,91	0,002	$7,28 \pm 0,09^{***}$	4,81	0,019
Нейтрофильные лейкоциты, ед. $\cdot 10^6$	$0,65 \pm 0,07^*$	129,03	0,0001	$10,38 \pm 0,41^{**}$	28,54	0,0004	$14,05 \pm 0,81^{\bullet}$	4,30	0,014
Эозинофилы, ед. $\cdot 10^6$	$0,01 \pm 0,003^*$	73,69	0,0001	$0,03 \pm 0,004^{\blacksquare}$	4,33	0,045	$0,62 \pm 0,02^{***}$	18,42	0,001
НЛ/АМ, у. е.	$0,55 \pm 0,07^*$	17,46	0,002	$1,58 \pm 0,08^{**}$	4,31	0,014	$2,10 \pm 0,03^{***}$	15,41	0,002

Примечание. * – достоверные различия с опытной группой; ** – достоверные различия с контрольной группой; *** – достоверные различия с группой сравнения; $\bullet$ – отсутствие достоверных различий с группой сравнения; $\blacksquare$ – отсутствие достоверных различий с контрольной группой.

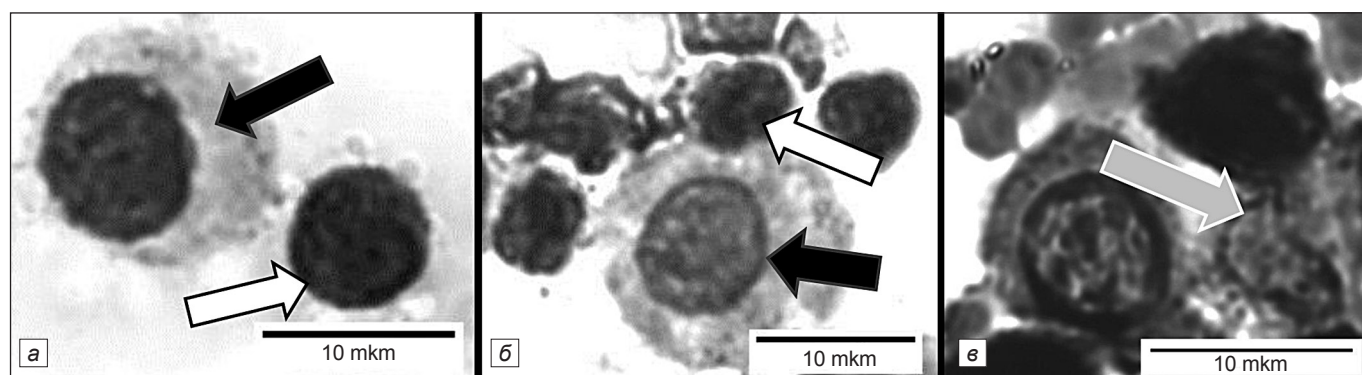


Рис. 1. Изображения клеток БАЛ крыс линии Wistar после однократного интратрахеального введения суспензии/физиологического раствора: а – контрольная группа; б – группа сравнения; в – опытная группа.

Чёрные стрелки указывают на альвеолярные макрофаги; белые – на нейтрофильные лейкоциты; серые – на эозинофилы.

группе сравнения – в 9,4 раза ($p = 0,0003$) по отношению к контролю (рис. 1, 2).

Увеличение общего количества клеток в опытной группе по отношению к группе сравнения составило 1,3 раза, но не имело достоверных различий ($p = 0,29$). Количество АМ в БАЛ опытной группы достоверно увеличено в 6,2 раза ($p = 0,0001$) относительно контроля и в 1,3 раза относительно группы сравнения ($p = 0,019$). Наибольший интерес представляют изменения количества НЛ и эозинофилов в БАЛ. У животных опытной группы наблюдается достоверное увеличение в 21,6 раза количество НЛ по отношению к группе контроля ($p = 0,0001$) и в 1,4 раза по отношению к группе сравнения ($p = 0,014$). В группе сравнения увеличение количества НЛ по отношению к контролю составило 16,0 раза ($p = 0,0004$). Увеличение количества эозинофилов в опытной группе по отношению к группе контроля составило 62 раза ($p = 0,0001$), по отношению к группе сравнения – 20,7 раза ($p = 0,001$). Содержание эозинофилов в БАЛ группы сравнения было увеличено в 3 раза по отношению к контролю ($p = 0,045$). В исследовании установлено, что показатель НЛ/АМ у животных опытной группы достоверно увеличен в 3,8 раза относительно показателя в контрольной группе ($p = 0,002$) и в 2,9 раза относительно показателя в группе сравнения ($p = 0,002$).

На основе полученных экспериментальных данных предложена модель зависимости количества эозинофилов и НЛ в БАЛ от общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия различного размера (рис. 3).

Согласно этой зависимости триггерная величина общей удельной площади поверхности частиц (S) оксида алюминия, воздействующих на дыхательные пути, составляет $0,6 \text{ м}^2$. Эта величина соответствует критическому

размеру частиц оксида алюминия, равному 52 нм. Согласно предложенной зависимости, количество эозинофилов в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности менее $0,6 \text{ м}^2$ определяется в соответствии с уравнением:

$$N_{\text{эл}} = (S \cdot N_{\text{эл}}) \cdot 10^6, \quad (1)$$

где $N_{\text{эл}}$ – количество эозинофилов в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной пло-

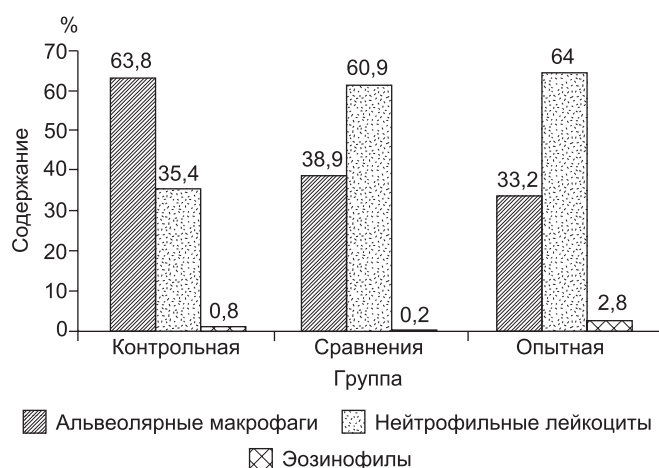


Рис. 2. Состав клеточных компонентов мазков БАЛ крыс линии Wistar через 24 ч после однократного интратрахеального введения суспензий нано- и микрочастиц оксида алюминия.

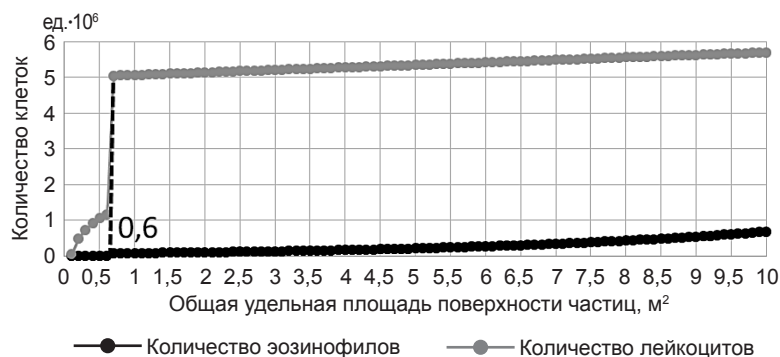


Рис. 3. Зависимость количества клеток БАЛ крыс линии Wistar от величины общей удельной площади поверхности дисперсных частиц оксида алюминия при однократном интратрахеальном введении.

щадь поверхности $< 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; S – общая удельная площадь поверхности частиц оксида алюминия, м^2 ; $N_{\text{эл}}$ – количество эозинофилов в БАЛ контрольной группы, $\text{ед.} \cdot 10^6$; 10^6 – коэффициент пересчёта.

Количество НЛ в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности менее $0,6 \text{ м}^2$ определяется в соответствии с уравнением:

$$N_{\text{эл}} = ((\text{НЛ} / \text{АМ})_{\text{норм}} \cdot \ln S + N_{\text{эл}}) \cdot 10^6, \quad (2)$$

где $N_{\text{эл}}$ – количество НЛ в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $< 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; $(\text{НЛ} / \text{АМ})_{\text{норм}}$ – отношение НЛ к альвеолярным макрофагам в контрольной группе, у.е.; S – общая удельная площадь поверхности частиц оксида алюминия, м^2 ; $N_{\text{эл}}$ – количество НЛ в контрольной группе, $\text{ед.} \cdot 10^6$; 10^6 – коэффициент пересчёта.

Количество НЛ в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности более $0,6 \text{ м}^2$ определяется в соответствии с уравнением:

$$N_{\text{эл}} = (N_{\text{эл}} + S \cdot (N_{\text{эл}} + N_{\text{эл}})) \cdot 10^6, \quad (3)$$

где $N_{\text{эл}}$ – количество НЛ в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $> 0,6 \text{ м}^2$ (группа сравнения), $\text{ед.} \cdot 10^6$; $N_{\text{эл}}$ – количество эозинофилов в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $< 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; S – общая удельная площадь поверхности частиц оксида алюминия, м^2 ; $N_{\text{эл}}$ – количество НЛ в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $< 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; $N_{\text{эл}}$ – количество АМ в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $< 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; 10^6 – коэффициент пересчёта.

Количество эозинофилов при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности более $0,6 \text{ м}^2$ определяется в соответствии с уравнением:

$$N_{\text{эл}} = (N_{\text{эл}} \cdot e^{0,23S}) \cdot 10^6, \quad (4)$$

где $N_{\text{эл}}$ – количество эозинофилов в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $> 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; $N_{\text{эл}}$ – количество эозинофилов в БАЛ при воздействии частиц оксида алюминия с общей удельной площадью поверхности $< 0,6 \text{ м}^2$, $\text{ед.} \cdot 10^6$; S – общая удельная площадь поверхности частиц оксида алюминия, м^2 ; 10^6 – коэффициент пересчёта.

Предложенные модели зависимости свидетельствуют, что при общей удельной площади поверхности частиц

оксида алюминия больше триггерной величины ($0,6 \text{ м}^2$) проявляется эозинофильная реакция, а при меньшей триггерной величине – лимфоцитарная реакция.

При визуальной оценке клеточных компонентов в БАЛ опытной группы и группы сравнения обнаружено наличие «пенистых макрофагов», что свидетельствует о наличии повреждений клеточных мембран [28]. Методом цифровой фотографической съёмки на разных фокусных расстояниях созданы трёхмерные реконструкции поверхности фиксированных клеток БАЛ, представленные на рис. 4.

Анализ изображений показал, что при воздействии нанодисперсного оксида алюминия поверхность АМ повреждена в большей степени относительно повреждений поверхности данных клеток при воздействии микродисперсного аналога. Среднее квадратичное отклонение в величине неровностей составляет $4,7 \pm 0,07 \text{ мкм}$, что в 13,4 раза выше показателя группы контроля ($0,38 \pm 0,01 \text{ мкм}$) ($F = 4,39$; $p = 0,015$) и в 3,6 раза выше показателя группы сравнения ($1,30 \pm 0,09 \text{ мкм}$) ($F = 16,53$; $p = 0,002$). Средний диаметр повреждений на поверхности макрофагов выше размера частиц, вводимых интратрахеально.

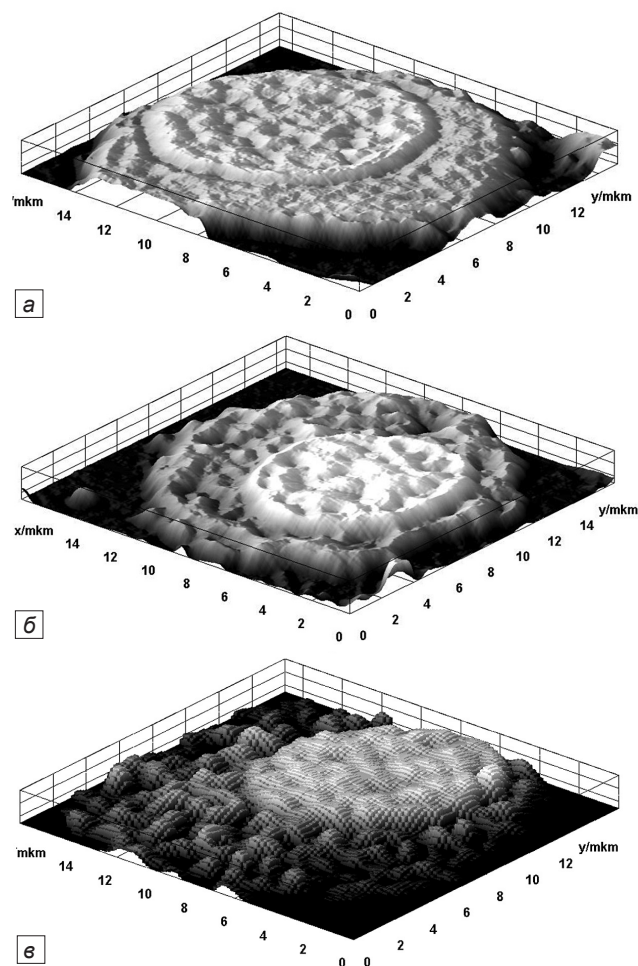


Рис. 4. Трёхмерная реконструкция морфологических параметров АМ БАЛ крыс линии Wistar при однократном интратрахеальном воздействии частиц оксида алюминия: а – контрольная группа (нет воздействия частиц); б – группа сравнения (воздействие частиц 10–20 мкм); в – опытная группа (воздействие частиц 13–20 нм).

В опытной группе средний диаметр повреждений равен $0,4 \pm 0,05$ мкм, что в 2,3 раза меньше, чем в группе сравнения ($0,9 \pm 0,08$ мкм) ($F = 7,71$; $p = 0,0079$). Среднее число повреждений АМ составило $2,4 \pm 0,04$ шт./мкм², что в 8 раз больше, чем в группе сравнения ($0,3 \pm 0,06$ шт./мкм²) ($F = 16,05$; $p = 0,005$). Доля повреждений АМ составила 18%, что 2,5 раза больше, чем в группе сравнения (7,2%) ($F = 8,87$; $p = 0,011$).

Предложена модель зависимости, описывающая степень повреждения поверхности альвеолярного макрофага от общей удельной площади поверхности частиц, введенных интратрахеально (рис. 5).

Согласно приведённой зависимости доля повреждений определяется в соответствии с уравнением:

$$P = n \cdot \ln S + 3, \quad (5)$$

где P – доля повреждений поверхности альвеолярного макрофага, %; n – среднее число повреждений на 1 мкм² поверхности макрофага; S – общая удельная площадь поверхности частиц оксида алюминия, м².

Обсуждение

Обобщение результатов сравнительной оценки реакции дыхательных путей крыс линии Wistar на однократное интратрахеальное введение микро- и наноразмерных частиц оксида алюминия показало, что степень их токсического воздействия зависит от дисперсности. Полученные данные согласуются с мнением ряда авторов, что с уменьшением размера частиц вещества увеличивается фактор дисперсности [15, 16]. Следствием этого может являться увеличение и их токсических свойств [8] характеризующих различные качественные и количественные цитологические изменения в биологических субстратах, в том числе в БАЛ.

При воздействии микрочастиц оксида алюминия клеточная реакция характеризуется преимущественным увеличением числа НЛ, а при воздействии наночастиц оксида алюминия – увеличением количества эозинофилов. Рост величины отношения НЛ/АМ в БАЛ является типичной реакцией при воздействии дисперсных частиц оксидов металлов на дыхательные пути [24]. Клеточная реакция со стороны органов дыхания зависит от общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия. Так, при общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия выше триггерной величины ($0,6$ м²) проявляется эозинофильная реакция, а при триггерной величине ниже данного показателя – лимфоцитарная реакция. Увеличение количества эозинофилов при относительно малом росте количества НЛ, выявленное при воздействии наночастиц оксида алюминия, может указывать на вероятность развития эозинофильного альвеолита, характерного для заболеваний органов дыхания с аллергокомпонентом (например, бронхиальной астмы) [29]. Увеличение числа НЛ при незначительном росте числа эозинофилов, выявленное при воздействии микрочастиц оксида алюминия, может свидетельствовать о вероятности развития лимфоцитарного альвеолита, сопровождающего такие патологические состояния органов дыхания, как силикоз [30].

Установлено, что интратрахеальное воздействие микро- и наноразмерных частиц оксида алюминия приводит к повреждению поверхности АМ. Степень повреждения макрофагов зависит от общей площади и частоты повреждений их поверхности. Предложена зависимость, описывающая степень повреждения АМ от величины общей удельной площади поверхности частиц, воздействующей на дыхательные пути крыс. Максимальная степень повреждения зафиксирована при воздействии наноразмер-

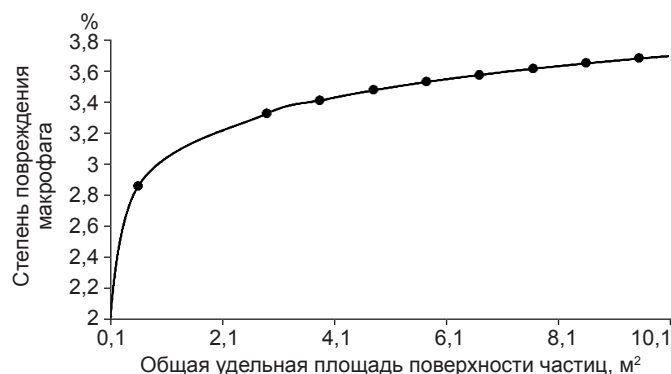


Рис. 5. Зависимость степени повреждения АМ БАЛ крыс линии Wistar от величины общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия при однократном интратрахеальном введении.

ных частиц, которая составила 18%, что в 2,4 раза выше, чем при воздействии микрочастиц.

Полученные результаты показали, что характеристика токсического действия наноразмерных частиц оксидов металлов, в том числе оксида алюминия, может быть расширена при использовании методов анализа цифровых изображений мазков БАЛ. Предложен оригинальный способ оценки параметров наноразмерных частиц оксида алюминия, апробация которого подтвердила возможность повышения степени объективизации при оценке токсичности наночастиц оксида алюминия, который может быть распространён и на другие оксидсодержащие наноразмерные частицы металлов.

Полученные количественные показатели целесообразно использовать для выявления поражений органов дыхания и при разработке профилактических мероприятий, направленных на минимизацию последствий воздействия нано- и микроразмерных частиц оксида алюминия на работников в ходе производства и населения, проживающего в зоне воздействия выбросов данных производств.

Выводы

1. Наноразмерный оксид алюминия по физическим характеристикам (среднепоперечный размер частиц, удельная площадь поверхности, концентрация частиц в суспензии, фактор дисперсности) значительно отличается от микроразмерного аналога (от 167 до 10^{10} раз), что может обуславливать его более высокую дисперсность, а следовательно, токсичность.
2. При однократном интратрахеальном введении крысам линии Wistar нано- и микродисперсного оксида алюминия в концентрации $80,0 \pm 0,09$ мг/мл в суспензии установлена более выраженная клеточная реакция в БАЛ при введении наноразмерных частиц по сравнению с микроразмерными частицами (по содержанию АМ в 1,3 раза, НЛ в 1,4 раза и эозинофилов в 20,7 раза, отношению НЛ/АМ в 2,9 раза).
3. Клеточная реакция со стороны органов дыхания зависит от общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия, триггерная величина которой составила $0,6$ м². При общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия выше триггерной величины проявляется эозинофильная реакция, ниже – лимфоцитарная реакция.
4. Степень повреждения поверхности АМ в БАЛ зависит от общей удельной площади поверхности частиц оксида алюминия, введенных интратрахеально. При введении наноразмерных частиц оксида алюминия общая

степень поврежденности АМ в БАЛ в 2,7 раза выше относительно микродисперсного аналога.

5. Характеристика токсического действия наноразмерных частиц оксидов металлов, в том числе оксида алюминия, при интратрахеальном введении может быть расширена при использовании методов анализа цифровых изображений мазков БАЛ.

Литература

(пп. 1, 2, 4–7, 9–18, 20–22, 24 см. References)

3. Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И. Окружающая среда и здоровье: Приоритеты профилактической медицины. *Гигиена и санитария*. 2014; 5: 5–10.
8. Андиферова И. В. Источники поступления наночастиц в окружающую среду. *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Машиностроение, материаловедение*. 2012; 14 (2): 54–66.
19. Привалова Л.И., Кацнельсон Б.А., Логинова Н.В., и др. Цитологические и биохимические особенности жидкости, получаемой при бронхо-альвеолярном лаваже у крыс после интратрахеального введения наноразмерных меднооксидных частиц. *Токсикологический вестник*. 2014; 5: 8–15.
23. Грег С., Синг К. *Адсорбция, удельная поверхность, пористость*. 2-е изд. М.: Мир, 1984: 306.
25. Кацнельсон Б.А. *Пневмокониозы: патогенез и биологическая профилактика*. Екатеринбург, 1995: 327.
26. Гланс С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика, 1998: 459.
27. Игнатова А.М., Землянова М.А., Степанков М.С., Игнатов М.Н. Определение морфометрических характеристик микродисперсной системы оксида алюминия методом анализа изображений. *Программные системы и вычислительные методы*. 2017; 3: 70–85.
28. Черняев А.Л., Самсонова М.В. *Патологическая анатомия легких: Атлас*. Под ред. А.Г. Чучалина. М.: Издательство «Атмосфера», 2004: 112.
29. Шапиро Н.А. *Цитологическая диагностика заболеваний легких: Цветной атлас*. 2005: 208.
30. Иванова Л.Г. Биологическое действие пылей бурых углей на бронхолегочную систему и иммунокомпетентные органы (экспериментальное морфологическое исследование). *Гигиена труда и профессиональные заболевания*. 1990; 2: 21–4.

References

1. Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* 2013; 10: 15.
2. Kelleher P., Pacheco K., Newman L.S., Inorganic dust pneumonias: the metal-related parenchymal disorders. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(4): 685–96.
3. Rakhmanin Yu.A., Mikhaylova R. I. Environment and Health: Priorities for Preventive Medicine. *Gigiena i sanitariya*. 2014; 5: 5–10 (in Russian).
4. Kisin E.R., Murray A.R., Keane M.J., Shi X.C., Schwegler-Berry D., Gorelik O., Arepalli S., Castranova V., Wallace W.E., Kagan V.E., Shvedova A.A. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol Environ Health.* 2007; 70: 2071–9.
5. Robertson T.A., Sanchez W.Y., Roberts M.S. Are commercially available nanoparticles safe when applied to the skin? *J Biomed Nanotechnol.* 2010; 6: 452–68.
6. Antonini J.M., Lewis A.B., Roberts J.R., Whaley D.A., Pulmonary effects of welding fumes: review of worker and experimental animal studies. *Am. J. Ind Med.* 2003; 43: 350–60.
7. Ruth Magaye JZ, Linda B, Min D: Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles (Review). *Exp Ther Med.* 2012; 4: 551–61.
8. Anciferova I.V. Sources of nanoparticles inflow to the environment. *Vestnik Permskogo nacional'nogo issledovatel'skogo politehnicheskogo universiteta. Mashinostroyeniye, materialovedeniye*. 2012; 14 (2): 54–66. (in Russian).
9. Santos R.J., Vieira M.T. Assessment of airborne nanoparticles present in industry of aluminum surface treatments. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2017; 14 (3): D29–D36. PMID: 27801631.

10. Krewski D., Yokel R. A., Nieboer E., Borchelt D., et al. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. *Journal of Toxicology Environmental Health. Part B*. 2007; 10(1): 1–269.
11. Friberg L., Nordberg G.F., Kessler E., Vouk V.B., et al. *Handbook of the Toxicology of Metals*. 2nd ed. Vols I, II: Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1986: 126.
12. Baer D., Munusamy P., Karakoti A., Thevuthasan S., et al. Ceriananoparticles: Environmental impacts on particle structure and chemistry. *In Bulletin of the American Physical Society*. APS March Meeting: Boston, MA, USA. 2012: 57.
13. Baer D.R., Engelhard M.H., Johnson G.E., Laskin J. et al. Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: Important needs and challenging opportunities. *Journal of Vacuum Science & Technology*. 2013; 31 (5): 50820. PMID: 24482557
14. Weibel E. R. Fractal geometry: a design principle for living organisms. *American Journal of Physiology*. 1991; 261: 361–9.
15. Li B., Ze Y., Sun Q., et al. Molecular mechanisms of nanosized titanium dioxide-induced pulmonary injury in mice. *Public Library of Science*. 2013; 8(2): pp. e55563. PMID: 23409001
16. AshaRani P.V., Mun G.L.K., Hande M.P., Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Ggenotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009; 3: 279–90.
17. Jortner J, Rao CNR Nanostructured advanced materials: perspectives and directions. *Pure Appl Chem*. 2002; 74(9):1491–506.
18. IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 2010; 92:1–853. PMID:21141735 PMID:18756632.
19. Privalova L.I., Kacnel'son B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., et al. Cytological and biochemical characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in rats after intratracheal instillation of copper oxide nano-scale particles. *Toksikol. vestnik*. 2014; 5: 8–15. (in Russian)
20. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D. 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: 508–24.
21. Xu J., Li Z., Xu P., Xiao L., Yang Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch. Toxicol.* 2013; 87: 1067–73.
22. Cassee F.R., Muijsers H, Duistermaat E., Freijer J.J., et al. Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. Application of a multiple path dosimetry model. *Arch Toxicol.* 2002; 76 (5-6):277–86.
23. Greg S., Sing K. Adsorption, specific surface, porosity [Adsorbtsiya, udel'naya poverkhnost', poristost']. 2-e izd. Moscow, Mir Publ., 1984: 306. (in Russian).
24. Mora C.F., Kwan A.Kh., Sphericity, shape factor, and convexity measurement of coarse aggregate for concrete using digital image processing. *Cement and Concrete Research*. 2000; 30: 351–8.
25. Katsnel'son B.A. Pneumoconiosis: pathogenesis and biological prophylaxis [Pnevmonkoniozy: patogenez i biologicheskaya profilaktika]. Ekaterinburg, 1995: 327. (in Russian).
26. Glants S. Medical and Biological Statistics [Mediko-biologicheskaya statistika]. Moscow, Praktika Publ., 1998: 459 (in Russian).
27. Ignatova A.M., Zemlyanova M.A., Stepankov M.S., Ignatov M.N. Morphometric features of micro-dispersed aluminum oxide: determination via analysis of images [Opredelenie morfometricheskikh kharakteristik mikrodispersnoi sistemy oksida alyuminiya metodom analiza izobrazhenii]. *Programmnye sistemy i vychislitel'nye metody*. 2017; 3: 70–85. (in Russian).
28. Chernyaev A.L., Samsonova M.V. *Pathologic anatomy of lungs: Atlas [Patologicheskaya anatomiya legkikh: Atlas]*. Pod red. A.G. Chuchalina. M.: Izdatel'stvo «Atmosfera», 2004: 112. (in Russian).
29. Shapiro N.A. *Cytological diagnostics of lung diseases: colored atlas [Tsitologicheskaya diagnostika zabolevaniy legkikh: Tsvetnoi atlas]*. 2005: 208. (in Russian).
30. Ivanova L.G. Biological effects produced by lignite dusts on the bronchopulmonary system and immune-competent organs (experimental morphological research) [Biologicheskoe deistvie pylei burykh uglei na bronkhologochnuyu sistemu i immunokompetentnye organy (eksperimental'noe morfologicheskoe issledovanie)]. *Gigiena truda i professional'nye zabolevaniya*. 1990; 2: 21–4. (in Russian).