

УДК 546.56 : 615.076

# ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЖИДКОСТИ, ПОЛУЧАЕМОЙ ПРИ БРОНХО-АЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ У КРЫС ПОСЛЕ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ МЕДНООКСИДНЫХ ЧАСТИЦ

Л.И. Привалова<sup>1</sup>, Б.А. Кацнельсон<sup>1</sup>,  
Н.В. Логинова<sup>1</sup>, В.Б. Гурвич<sup>1</sup>, В.Я. Шур<sup>2</sup>,  
Я.Б. Бейкин<sup>3</sup>, М.П. Сутункова<sup>1</sup>,  
И.А. Минигалиева<sup>1</sup>, Е.В. Шишкина<sup>2</sup>,  
С.В. Пичугова<sup>3</sup>, Л.Г. Тулакина<sup>3</sup>,  
С.В. Беляева<sup>3</sup>, В.О. Рузаков<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>МУ «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, Российская Федерация

**С**табильные водные суспензии частиц оксида меди диаметром 20 нм и меднооксидных-медных частиц диаметром 340 нм были введены крысам интратрахеально в дозе 0,5 мг (1 мл), и через 24 часа был проведен бронхо-альвеолярный лаваж, охарактеризованный с помощью оптической, просвечивающей электронной и полуконтактной атомно-силовой микроскопии и ряда биохимических показателей. Найдено, что обе фракции оказывают выраженное токсическое действие на лёгкие, однако наночастицы существенно токсичнее, чем субмикронные частицы крупнее 100 нм, но в то же время их отложение вызывает более выраженную защитную реакцию мобилизации альвеолярных макрофагов и особенно нейтрофильных лейкоцитов при более высокой фагоцитарной активности этих клеток. Полученные результаты в сопоставлении с литературными данными свидетельствуют о том, что причинами высокой цитотоксичности действия меднооксидных частиц нанометровой размерности является как внутриклеточный релиз ионов меди при их растворении, так и прямой контакт персистирующих частиц с клеточными органеллами (в первую очередь митохондриями) и их повреждение.

**Ключевые слова:** ультратонкие медьсодержащие частицы, бронхоальвеолярный лаваж, цитотоксичность.

**Привалова Лариса Ивановна (Privalova Larisa Ivanovna)**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, ул. Попова, 30 Е, privaloval@yandex.com

**Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich)**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, ул. Попова, 30 Е, bkaznelson@etel.ru

**Логинова Надежда Владимировна (Loginova Nadezhda Vladimirovna)**, научный сотрудник лаборатории научных основ биопрофилактики ФБУН ЕМНЦПОЗРПП, 620142, г. Екатеринбург, loginovan@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

**Бейкин Яков Борисович (Beikin Yakov Borisovich)**, доктор медицинских наук, профессор, директор МУ «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, kdc\_boss@mail.ru

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

**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

**Пичугова Светлана Владимировна (Pichugova Svetlana Vladimirovna)**, специалист лаборатории электронной микроскопии «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, ekb-lem@mail.ru

**Тулакина Людмила Геннадьевна (Tulakina Ludmila Gennadevna)**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией электронной микроскопии «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, tulakina@inbox.ru

**Беляева Светлана Валентиновна (Beljajeva Svetlana Valentinovna)**, кандидат биологических наук, заведующий биохимической лабораторией МУ «Клинико-диагностический центр», 620142, г. Екатеринбург, kdc\_boss@mail.ru

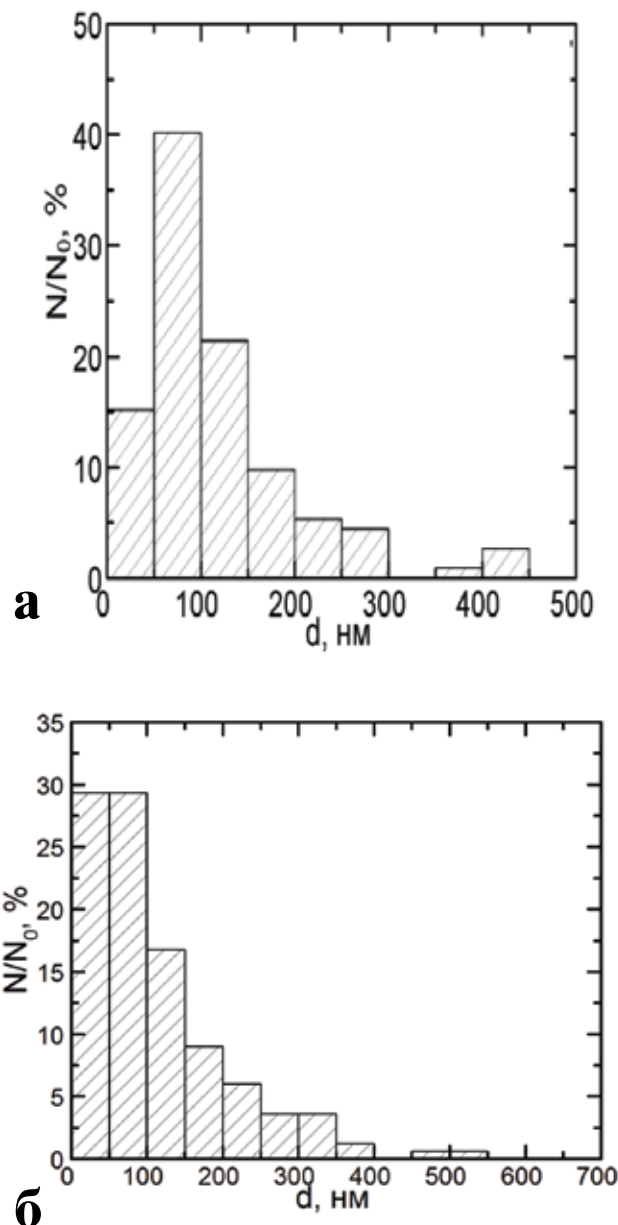
**Рузаков Вадим Олегович (Rusakov Vadim Olegovich)**, аспирант ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП, 620014, г. Екатеринбург, ruzakov\_vo@66.rospotrebnadzor.ru

**Введение.** Если еще 5 лет тому назад было вполне оправданным предостережение, что «общепринятая убежденность в особой токсичности наночастиц основана на ограниченном числе исследований» [1], то к настоящему времени экспериментальных подтверждений этой убежденности накоплено немало, хотя другая не менее распространенная идея, согласно которой наночастицы особо опасны еще и потому, что якобы не распознаются защитными физиологическими механизмами (в частности, легочными макрофагами [2]), скорее всего ошибочна. В частности, нашими исследованиями, проведенными с наночастицами (НЧ) оксида железа [3–5], золота и серебра [6], их высокая токсичность и вместе с тем особая активность защитной реакции фагоцитоза при их отложении в глубоких дыхательных путях были показаны при сравнении с действием соответствующих по химическому составу микрочастиц (МЧ) диаметром 1 мкм. В пределах условленного нанодиапазона (до 100 нм) эти особенности также тем менее выражены, чем больше размеры НЧ.

Вместе с тем, в известных нам экспериментальных исследованиях не оценивались с этих позиций различия между НЧ и частицами, имеющими размеры более 100 нм, но менее 1 мкм, хотя давно уже подчеркивалось [7], что «не существует строгой разделительной линии между наночастицами и не наночастицами. Размер, при котором материалы проявляют свойства, отличные от их свойств в массе, зависят от того, о каком материале речь, и на это определенно могут претендовать также те, размеры которых превышают 100 нм».

Как известно, при высокотемпературных металлургических и сварочных технологиях в воздух рабочих помещений выделяются аэрозоли конденсации металлов и, главным образом, их оксидов, в дисперсном составе которых преобладают субмикронные частицы. Значительная фракция этих частиц может быть отнесена к НЧ, наряду с частицами, измеряемыми сотнями нанометров. Подобная ситуация характерна, в частности, для плавки и разлива меди (рис. 1), что и послужило поводом к проведению данного исследования.

Недавно мы [8] показали, что при повторных внутрибрюшных введениях на протяжении 7 недель суспензии сферических частиц оксида меди диаметром 20 нм развиваются многие функциональные, биохимические и гистопатологические признаки субхронической медной интоксикации, а также полиорганная фрагментация ДНК (ПДАФ тест). В литературе немало данных [9–18] о том, что медные и медноокисные НЧ обладают высокой цито- и генотоксичностью, но преобладают оценки *in vitro* на куль-



**Рис. 1.** Процентное распределение по диаметрам частиц субмикронного диапазона на поликарбонатных фильтрах, через которые был протянут воздух на рабочих местах при разливе (а) анодной и (б) катодной меди (N – число частиц данного диаметра, N<sub>0</sub> – общее число измеренных частиц).

турах клеток различных стабильных линий. Напротив, в наших исследованиях [3–6, 18] цитотоксичность наночастиц магнетита (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), серебра и золота и активность ключевого защитного механизма, каким является реакция фагоцитоза отложившихся в дыхательных путях частиц, были оценены *in vivo* по изменениям свободной клеточной популяции глубоких дыхательных путей после однократной интратрахеальной инстилляцией этих материалов. Эта же методология была применена в данном исследовании, проведенном со специально приго-

товленными медьсодержащими частицами, моделирующими субмикронную и нанофракции промышленных аэрозолей, образующихся при плавке и разливке меди.

**Материалы и методы.** Для интратрахеального введения использовались специально приготовленные суспензии. Сферические НЧ со средним ( $\pm\sigma$ ) диаметром  $20\pm 10$  нм были получены лазерной обработкой поверхности медной пластины чистотой 99,99% в стерильной деионизированной воде. Судя по результатам рентгеновского энергодисперсионного анализа, в составе этих НЧ атомное соотношение Cu:O близко к 1:1.

Суспензия сферических субмикронных частиц (СМЧ) со средним ( $\pm\sigma$ ) диаметром  $340\pm 168$  нм была получена из водной взвеси порошка, образовавшегося при электрическом взрыве медной проволоки той же чистоты. С помощью рентгеновского энергодисперсионного анализа найдено, что в поверхностном слое СМЧ, имеющем толщину около 80 нм, атомное соотношение Cu:O соответствует оксиду меди (I) ( $Cu_2O$ ), а ядро этой частицы образовано элементной медью (Cu).

Обе суспензии на деионизированной воде высоко стабильны, но при добавлении к ним физраствора или жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) интактных крыс (в объемном отношении 1:3), за 24 часа СМЧ теряют растворяющийся оксидный слой, а НЧ растворялись практически полностью уже за 90 мин.

Эксперимент был проведен на аутбредных белых крысах-самках весом 150–220 г по 12 особей в каждой подопытной и контрольной группе. БАЛЖ получали через 24 часа после интратрахеального введения 1 мл суспензии НЧ

или СМЧ (по 0,5 мг) или воды, на которой они готовились. После подсчета меланжерным способом общей клеточности в аликвотной пробе БАЛЖ отцентрифугированный клеточный осадок использовался: (а) для приготовления мазков, окрашиваемых по Гимза-Романовскому, в которых производился дифференциальный подсчет клеток при оптической микроскопии с иммерсией; (б) для изучения топографии поверхности клеток при полуконтактной атомно-силовой микроскопии или (в) для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Техника этих исследований детально описывалась нами ранее [5,18,19].

**Результаты и обсуждение.** Данные оптической микроскопии, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что как НЧ, так и СМЧ, отложившиеся в глубоких дыхательных путях, вызывают резкое увеличение (по сравнению с контрольной БАЛЖ) абсолютного числа нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) и менее выраженное, но тоже статистически значимое увеличение числа альвеолярных макрофагов (АМ) при существенном увеличении численного отношения НЛ/АМ, которое после введения НЧ значительно выше, чем после введения СМЧ.

Мобилизация фагоцитирующих клеток в глубокие дыхательные пути, отражаемая увеличением клеточности БАЛЖ, является типичной реакцией на отложение в них каких бы то ни было частиц. Однако и общее число клеток, и в особенности сдвиг в сторону преимущественной мобилизации НЛ тем более выражены, чем интенсивнее повреждающее действие частиц на АМ, являющееся проявлением их цитотоксичности [20–22].

Такая зависимость определяется многоуровневым стимулирующим действием продуктов

Таблица 1

**Число клеток в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа, проведенного через 24 часа после интратрахеального введения 1 мл стерильной деионизированной воды или водной суспензии, содержащей 0,5 мг медьсодержащих частиц ( $x \pm Sx$ ).**

Введено:	число клеток ( $\times 10^6$ )			НЛ/АМ
	всех	нейтрофильных лейкоцитов (НЛ)	альвеолярных макрофагов (АМ)	
Наночастицы (НЧ)	$12,42\pm 1,89^*$	$9,8\pm 2,16^*$	$2,44\pm 0,38^*$	$4,76\pm 1,39^*$
Субмикронные частицы (СМЧ)	$6,79\pm 1,28^*$	$3,64\pm 0,90^*$	$3,06\pm 0,86^*$	$1,39\pm 0,16^*$
Вода (контроль)	$1,06\pm 0,14$	$0,052\pm 0,01$	$0,95\pm 0,18$	$0,06\pm 0,01$

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контрольной группы, ● – от группы, получившей СМЧ ( $p < 0.05$  по t Стьюдента).

разрушения макрофага (ПРМ) на гранулоцито-моноцитопоз, аттракцию НЛ и АМ и функциональную активность обоих типов клеток [23]. Однако мобилизация АМ нарастает с увеличением дозы ПРМ менее круто, чем мобилизация НЛ [20, 21]. Поэтому если баланс между разрушением АМ под действием частиц и компенсаторной мобилизацией НЛ всегда положительный, то над мобилизацией новых АМ разрушение АМ при действии особо цитотоксичных частиц может превалировать. Поэтому число АМ в БАЛЖ обычно повышено в меньшей степени, чем число НЛ либо не повышено вообще. Это отражается повышением показателя НЛ/АМ, который в целом оказывается информативным критерием цитотоксичности отложившихся частиц.

Таким образом, судя по данным таблицы 1, медьсодержащие НЧ гораздо более цитотоксичны, чем СМЧ. Ранее в экспериментах с частицами магнетита, серебра и золота [3–6, 18] мы показали, используя те же критерии цитотоксичности, что при совпадающем химическом составе она (как и многие показатели системной токсичности) нарастает с уменьшением размера частицы, а при совпадающем размере зависит от химической природы частицы. Различие же по цитотоксичности между медьсодержащими НЧ и СМЧ, по-видимому, зависит от обеих причин. Отметим, что производной характеристикой частицы, зависящей как от ее размера, так и от химической природы, является растворимость. Растворение НЧ в модельной биологической среде *in vitro* выше растворимости СМЧ, а это различие важно в свете активной литературной дискуссии по вопросу о том, определяется ли высокая цитотоксичность меднооксидных НЧ их прямым действием на клетку или преимущественно внутриклеточным релизом  $\text{Cu}^{2+}$ -иона [10–13, 16].

Однако мы считаем важными оба механизма, поскольку в пользу проникновения внутрь фагоцита персистирующих меднооксидных НЧ и повреждения ими клеточных органелл говорят другие наши результаты, полученные с помощью полуконтактной атомно-силовой (пк-АСМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

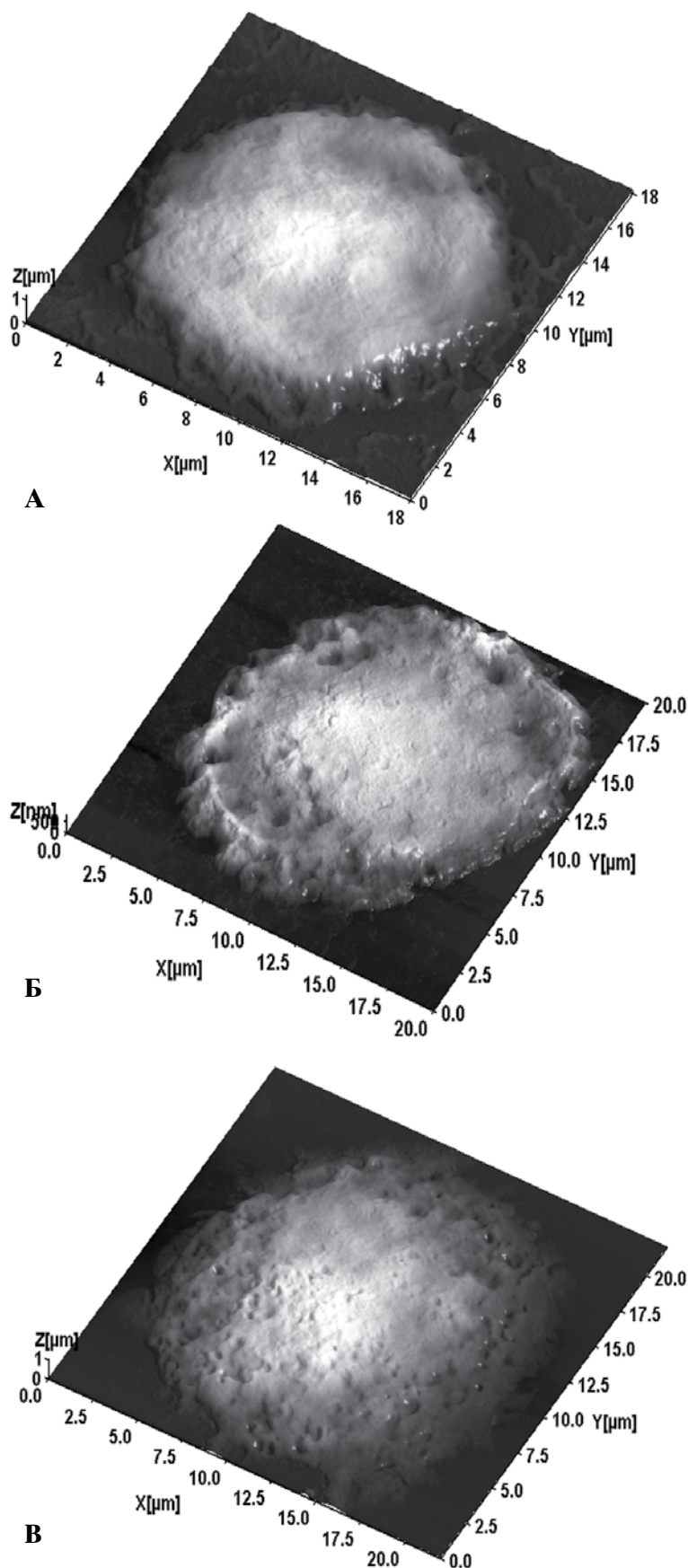
При пак-АСМ клеток БАЛЖ у крыс, которым были введены оба типа частиц, обнаружено, что их поверхность, в отличие от поверхности клеток контрольных крыс, испещрена микроямками, число которых при воздействии НЧ явно больше, а преобладающие размеры – меньше, чем при воздействии СМЧ. Эта визуальная оценка (рис. 2) подтверждается статистической. Средний диаметр ямки ( $\pm s_x$ ) равен  $25,2 \pm 0,9$  нм в случае воздействия НЧ и  $290 \pm 14$  нм в случае

воздействия СМЧ, а среднее число ямок на единицу поверхности ( $\text{мкм}^2$ ) равно  $74,40 \pm 3,72$  и всего  $1,85 \pm 0,09$  соответственно.

Воспроизводимость этого впервые описанного нами [3] в 2010 году эффекта в последующих экспериментах со всеми исследованными наночастицами убеждает в его неслучайности. Вероятнее всего, каждая микроямка представляет собой след той инвагинации клеточной (плазматической) мембраны, с которой начинается эндоцитоз (фагоцитоз) – процесс активного поглощения частицы фагоцитом. Число таких ямок является, таким образом, показателем фагоцитарной активности единичной клетки. То, что эта активность тем выше, чем выше цитотоксичность частиц (благодаря их меньшему размеру и/или химической природе), в случае магнетита было показано также подсчетом частиц внутри АМ и НЛ [5]. Такая зависимость между цитотоксичностью частицы и жадностью ее поглощения может быть объяснена активацией фагоцита под влиянием ПРМ, что было ранее доказано в эксперименте *in vitro* с полистирольными бусинками диаметром 1  $\text{мкм}$  [23].

Через полтора часа после добавления супернатанта БАЛЖ к высоко стабильной водной суспензии меднооксидных НЧ их не удается обнаружить методом оптического поглощения, что свидетельствует о практически полном растворении этих НЧ. Между тем картина, получаемая при пак-АСМ, свидетельствует о наличии фагоцитируемых (то есть еще не растворившихся) НЧ на свободной поверхности глубоких дыхательных путей даже через 24 часа после отложения этих частиц. Таким образом, в реальной жидкой среде *in vivo* быстрого и полного растворения этих НЧ явно не происходит.

Наличие таких персистирующих НЧ внутри АМ и НЛ через 24 часа после интратрахеального введения (к которым следует добавить около 1,5 ч после получения БАЛЖ до момента фиксации клеточного осадка глицеральдегидом) прямо демонстрируют данные ПЭМ. Однако их значение состоит в оценке не только внутриклеточной локализации частиц, но и вызываемых ими ультраструктурных повреждений фагоцитирующих клеток. Судя по многочисленным данным, обобщенным в обширном обзоре [24], мишенями цитотоксического действия различных наночастиц оказываются: клеточная мембрана (Ag, Au, CeO, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, оксид железа, квантовые точки), ядро (Ag, Au, CeO, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO), митохондрии (Ag, SiO<sub>2</sub>, ZnO), лизосомы (CeO, TiO<sub>2</sub>, ZnO), эндоплазматический ретикулум (Ag, SiO<sub>2</sub>), цитоскелет (Ag, Au, CeO, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, квантовые точки), а возможно, и аппарат Гольджи (TiO<sub>2</sub>, оксид железа). Для каждого вида НЧ обычно описываются различные

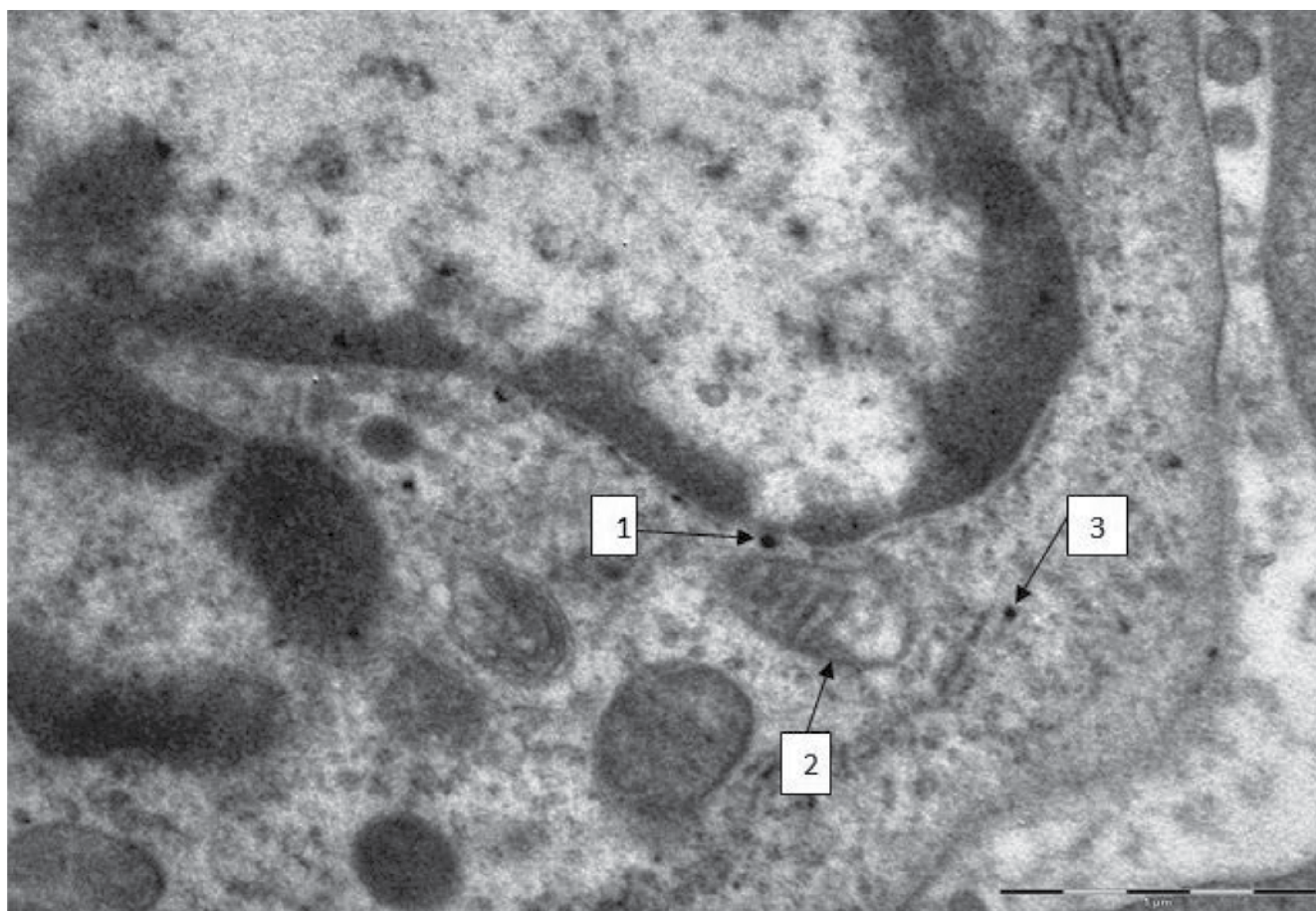


**Рис. 2.** Визуализация с помощью полуконтактной атомно-силовой микроскопии топографии поверхности альвеолярного макрофага контрольной крысы (А) и после интратрахеального введения СМЧ (Б) или НЧ (В).

точки приложения действия, однако следует подчеркнуть, что приведенное перечисление не является исчерпывающим. Наши эксперименты с наноксидом железа ( $Fe_3O_4$ ) [19], наносеребром и нанозолотом [18] выявили повреждение ядерной мембраны и особенно – митохондрий. Отметим, что в обзоре [24] медьсодержащие НЧ вообще не упоминаются. Между тем нами при электронной микроскопии как АМ, так и НЛ выраженные ультраструктурные повреждения клетки (в особенности митохондрий, а также клеточной и ядерной мембран) наблюдаются даже при обнаружении в ней очень небольшого числа частиц, что иллюстрируется рисунком 3.

Повреждение митохондрий может отражать развитие «оксидативного взрыва», что согласуется с мнением многих авторов об образовании свободных кислородных радикалов как важном механизме цитотоксичности металлосодержащих, в том числе меднооксидных НЧ (например [9, 24]).

Показателем цитотоксического повреждения фагоцитирующих клеток частицами, наряду с цитологическими данными, являются 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 [25]. 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  $TiO_2$ , но в гораздо меньшей, чем после введения наночастиц кобальта и особенно никеля [26]. В другом эксперименте эти же исследователи [27] нашли, что через 3 дня после интратрахеального 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. Повышение концентрации лизосомальных ферментов обычно объясняют их релизом в результате повреждения частицами



**Рис. 3.** Альвеолярный макрофаг из БАЛЖ крысы, получившей НЧ оксида меди (ПЭМ, увеличение  $\times 22\ 000$ ). Одиночная НЧ вблизи ядерной мембраны альвеолярного макрофага (стрелка 1). Отмечается нечеткость мембраны, нарушение ее двухконтурности в зоне локализации частицы. У митохондрии около этой частицы (стрелка 2) видно частичное отсутствие крист и просветление митохондриального матрикса; оставшиеся кристы имеют признаки деструкции, а митохондриальная мембрана нечеткая, прерывистая, местами потерявшая двухконтурность. Одиночная наночастица внутри другой, почти полностью разрушенной митохондрии (стрелка 3).

фаголизосом макрофага, а также эпителиальных клеток. Как видно из наших данных, приведенных в таблице 2, при действии медьсодержащих частиц наряду с повышением концентрации ЛДГ была повышена концентрация двух других лизосомальных ферментов (амилазы и глютамилтрансферазы), которое может получить аналогичное объяснение.

Как видно из той же таблицы, статистически значимое отличие от контрольных величин при воздействии НЧ наблюдалось также по ряду других показателей, в то время как при воздействии субмикронных МЧ соответствующие сдвиги либо отсутствовали, либо были менее выражены (как правило, при достаточной статистической значимости межгрупповых различий) [1].

Причиной всех этих сдвигов, кроме цитотоксического действия, вероятно, могут быть вызываемые медью, в том числе переходящей в раствор в ионной форме, острые воспалитель-

ные изменения легочной ткани и связанное с ними повышение проницаемости сосудов. О втором механизме наиболее убедительно свидетельствует повышение концентрации всех 4 измеренных катионов, и тот же механизм повышения концентрации в БАЛЖ наиболее вероятен для глюкозы, мочевины, мочевой кислоты.

Вместе с тем неравное повышение активности аминотрансфераз (АлТ и в еще большей степени АсТ), которое сопровождается повышением соотношения между ними (коэффициента де Ритиса), возможно, связано с повреждением легочной ткани, в клетках которой, как известно, эти ферменты обнаруживаются.

**Заключение.** Присутствие в составе аэрозолей, загрязняющих воздух рабочих помещений при высокотемпературных металлургических технологиях (в частности, при плавке и разливке меди) субмикронных частиц, не только относящихся к условленному нанодиапазо-

Таблица 2

**Некоторые биохимические характеристики жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) у крыс через 24 часа после интратрахеального введения 0,5 мг медьсодержащих нано- или субмикронных частиц в 1 мл водной суспензии ( $x \pm Sx$ )<sup>1)</sup>**

Показатели	Группы крыс, получившие:		
	воду (контроль)	наночастицы	субмикронные частицы
Глюкоза, ммоль/л	0,56±0,00	1,36±0,25* <sup>●</sup>	0,56±0,00
Азот мочевины, ммоль/л	0,36±0,00	0,68±0,10* <sup>●</sup>	0,36±0,00
Мочевая кислота, мкмоль/л	14,67±0,33	16,75±0,50* <sup>●</sup>	14,25±0,25
Амилаза, мкмоль/л*мин.	30,00±0,00	140,25±3,50* <sup>●</sup>	30,00±0,00
АлТ, мкмоль/л*мин.	21,33±0,67	25,25±0,29* <sup>●</sup>	22,00±0,41
АсТ, мкмоль/л*мин.	7,33±1,20	39,75±2,29* <sup>●</sup>	19,50±1,66*
Коэффициент де Ритиса	0,34±0,05	1,57±0,08* <sup>●</sup>	0,88±0,07*
Глютамилтрансфераза, мкмоль/л*мин	5,33±0,33	14,50±0,87*	10,25±0,63*
Лактатдегидрогеназа, мкмоль/л*мин.	166,67±30,33	821,50±9,50* <sup>●</sup>	601,75±54,65*
Кальций, ммоль/л	0,12±0,00	0,25±0,02* <sup>●</sup>	0,12±0,00
Магний, ммоль/л	0,12±0,00	0,16±0,01* <sup>●</sup>	0,12±0,00
Фосфор, ммоль/л	0,14±0,01	0,25±0,02* <sup>●</sup>	0,14±0,00
Железо, мкмоль/л	0,40±0,00	0,83±0,21* <sup>●</sup>	0,40±0,00

Примечание: \* – статистически значимое отличие от контрольной группы, ● – от группы, получившей СМЧ ( $p < 0.05$  по t Стьюдента).

<sup>1)</sup> В таблицу 2 не включены показатели, по которым не было отличий от контроля (общий белок, альбумин, креатин, креатинкиназа, липаза), а также щелочная фосфатаза, повышение содержания которой было статистически недостаточно значимым.

ну, но и имеющих размеры свыше 100 нм, делает важной сравнительную оценку действия таких частиц на организм. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что субмикронные и в особенности наночастицы вызывают при отложении в глубоких дыхательных путях активную защитную реакцию мобилизации альвеолярных макрофагов (АМ) и в еще большей степени – нейтрофильных лейкоцитов (НЛ). Эти клетки обладают высокой фагоцитарной активностью по отношению к субмикронным частицам, но в еще большей степени – к наночастицам. В то же время последние вызывают более существенное увеличение численного отношения НЛ/АМ, что (наряду с биохимическими сдвигами в жидкости бронхо-альвеолярного лаважа) свидетельствует об

их более высокой цитотоксичности и, вероятно, большей токсичности для легочной ткани в целом (пульмонотоксичности).

Мы полагаем, что цитотоксический эффект лишь отчасти может быть связан с действием иона меди, образующегося при растворении частиц (которое в случае наночастиц происходит более интенсивно), поскольку при электронной микроскопии видна явная связь ультраструктурных повреждений клетки с внутриклеточной локализацией персистирующих частиц. В частности, выраженное повреждение митохондрий согласуется с распространенными представлениями о роли кислородного взрыва как важного механизма цитотоксического действия металлических, в том числе медьсодержащих наночастиц.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES:

1. Warheit D.B., Reed K.L., Sayes C.M. A role of surface reactivity in TiO<sub>2</sub> and quartz-related nanoparticle pulmonary toxicity. *Nanotoxicology*. 2009; 3: 181–187.
2. Donaldson K., Stone V., Tran C.K., Kreyling W., Borm P.J. *Nanotoxicology* (editorial). *Occup Environ Med*. 2004; 61: 727–728.
3. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., Minigaliev 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 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 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.
4. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Sutunkova M.P., Yeremenko O.S., Minigaliev A., Kireyeva E.P., Kozitsina A.N., Malakhova N.A., Glazyrina J.A. et al. Experimental estimates of the toxicity of iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetite) nanoparticles. *Cent. Eur. J. Occup. Environ. Med*. 2010; 16: 47–63.
5. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Tulakina L.G., Pichugova S.V., Beikin J.B., Khodos M.Y. The «in vivo» interaction between iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and alveolar macrophages. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2012; 152: 627–631.
6. 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 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.
7. Bastus N.G., Casals E., Socorro V.-C., Puentes V. Reactivity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological media. *Nanotoxicology*. 2008; 2: 99–112.
8. Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol*. 2008; 21: 1726–1732.
9. Xu J., Li Z., Xu P., Xiao L., Yang Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch. Toxicol*. 2013; 87: 1067–1073.
10. Bondarenko O., Ivask A., Käkinen A., Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ. Pollut*. 2012; 169: 81–89.
11. Pang C., Selck H., Misra S.K., Berhanu D., Dybowska A., Valsami-Jones E., Forbes V.E. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. *Aquat. Toxicol*. 2012; 15: 114–122.
12. Studer A.M., Limbach L.K., van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E.K., Gerber L.C., Moch H., Stark W.J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol. Lett*. 2010; 1: 169–174.
13. Cronholm P., Karlsson H.L., Hedberg J., Lowe T.A., Winnberg L., Elihn K., Wallinder I.O., Möller L. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small*. 2013; 8: 970–982.
14. Cuillel M., Chevallet M., Charbonnier P., Fauquant C., Pignot-Paintrand I., Arnaud J., Cassio D., Michaud-Soret I., Mintz E. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions. *Nanoscale*. 2014; 16: 1707–1715.
15. Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol. Lett*. 2006; 25: 109–120.
16. Limbach L.K., Studer A.M., Van Duc L. et al. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol. Lett*. 2010; 197(3): 169–174.
17. Alarifi S., Ali D., Verma A., Alakhtani S., Ali B.A. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *Int. J. Toxicol*. 2013; 32: 296–307.
18. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E. et al. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 12379–12406.
19. 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. *Environ. Health Perspect*. 1980; 35: 205–218.
20. 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.
21. Katsnelson B.A., Konyshva L.K., Privalova L.Y., Sharapova N.Y. Quartz dust retention in rat lungs under chronic exposure simulated by a multicompartmental model: Further evidence of the key role of the cytotoxicity of quartz particles. *Inhalat Toxicol*. 1997; 9: 703–715.
22. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Sharapova N.Y., Kisiltsina N.S. On the relationship between activation and the breakdown of macrophages in pathogenesis of silicosis. *Med. Lav*. 1995; 86: 511–521.
23. Fröhlich E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *J. Curr. Drug. Metab*. 2013; 14: 976–988.
24. 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.
25. 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. and Environmental Health*. 1998; 53: 423–438.
26. 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.

L.I. Privalova<sup>1</sup>, B.A. Katsnelson<sup>1</sup>, N.V. Loginova<sup>1</sup>, V.B. Gurvich<sup>1</sup>, V. Ya. Shur<sup>2</sup>, Ya.B. Beikin<sup>3</sup>, M. P. Sutunkova<sup>1</sup>, I.A. Minigaliev<sup>1</sup>, E.V. Shishkina<sup>2</sup>, S. V. Pichugova<sup>3</sup>, L. G. Tulakina<sup>3</sup>, S.V. Beljayeva<sup>3</sup>, V. O. Rusakov<sup>1</sup>.

### CYTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN RATS AFTER INTRATRACHEAL INSTILLATION OF COPPER OXIDE NANO-SCALE PARTICLES

<sup>1</sup>Ekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection of Industrial Workers, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup>The Centre for collective use «Modern Nanotechnologies», Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>3</sup>The City Clinical Diagnostics Centre, 620142 Ekaterinburg, Russian Federation

Stable water suspensions of copper oxide particles with the mean diameter of 20 nm and copper oxide-copper ones with the mean diameter of 340 nm were used to assess the rats pulmonary phagocytosis response to a single intratracheal instillation of 0.5 mg(1 ml) of these suspensions followed by the bronchoalveolar lavage after 24 hours with the help of optical, transmission electron, and semi-contact atomic force microscopy and a number of biochemical indices measured in the bronchoalveolar lavage fluid. It was found out that the two fractions produce an expressed toxic effect on lungs but nanoparticles appear significantly more toxic than sub-micron particles greater than 100 nm in size while the former evokes a more pronounced defense recruitment of alveolar macrophages and especially of neutrophil leukocytes at a higher phagocytosis activity of these cells. Results obtained compared to literature data show that a high cytotoxic action of nanometer copper oxide particles may be caused both by a copper ions intracellular release at solubilization and direct contact of persistent particles internalized by phagocytes with cell organelles (primarily, mitochondria) and their injury as well.

**Key words:** ultrafine copper-containing particles, bronchoalveolar lavage, cytotoxicity.

Материал поступил в редакцию 13.08.2014 г.