

Ю.І. Кундієв
О.В. Демецька
Т.К. Кучерук
В.О. Мовчан
Н.Л. Новіченко
Л.А. Налескіна

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЧАСТИНОК НАНОДІАПАЗОНУ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЇХ РОЗМІРУ

Інститут медицини праці
АМН України

Інститут експериментальної
патології, онкології та
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: наночастинки,
ультрадисперсні частинки,
зварювальні аерозолі,
високодисперсні аморфні
кремнеземи.

Резюме. На підставі аналізу даних літератури та результатів власних експериментальних досліджень зроблено припущення, що наночастинки, які є присутніми у повітрі робочої зони, можуть сприяти підвищенню захворюваності та смертності від патології органів дихальної і серцево-судинної систем. Зокрема, високий рівень захворюваності електрозварників може бути обумовлений не тільки власне токсичністю компонентів зварювальних аерозолів, а й здатністю до глибокого проникнення в тканини їх найбільш дрібних частинок. На підставі даних власних експериментальних досліджень підтверджено припущення щодо збільшення біологічної активності речовин, що знаходяться у вигляді наночастинок. Зокрема, встановлено, що патогенна дія малотоксичних речовин (аморфні кремнеземи) суттєво зростає, якщо вони знаходяться у вигляді ультрадисперсних частинок.

ВСТУП

Як відомо, дослідження впливу частинок нанодіапазону на організм людини є одним з пріоритетних напрямків сучасної науки. Мабуть, для поняття «нанотехнологія» поки що не існує вичерпного визначення, але можна сказати, що нанотехнології — це такі, що оперують величинами порядку нанометру (10^{-9} м). Зокрема, це нанотехнологічний контроль виробів та матеріалів на рівні атомів, створення з наночастинок нових матеріалів з високим коефіцієнтом використання (порошкова технологія), так звана адресна доставка лікарських речовин за допомогою різноманітних наноносіїв, а також створення високодисперсних матеріалів для потреб різних галузей промисловості, сільського господарства та біомедицини. Частинки нанодіапазону умовно поділяють на 2 групи: ультратонкі/ультрадисперсні/ультрамалі (аеродинамічний діаметр < 100 нм) та тонкі/малі (аеродинамічний діаметр > 100 нм). Інтерес вчених до наночастинок у першу чергу обумовлений тим фактом, що вони займають проміжне положення між атомно-молекулярним та конденсованим станом речовини. Навіть прості нанооб'єкти (наприклад наночастинки металів) мають фізичні і хімічні властивості, відмінні від властивостей більш великих об'єктів з того ж матеріалу, а також від властивостей окремих атомів. Одна з головних відмінних рис наночастинок полягає у великій площі поверхні [6, 9].

Бурхливий розвиток нанотехнологій, поява нових антропогенних джерел забруднення оточуючого середовища, а також дані щодо фізико-хімічних властивостей наночастинок ініціювали вивчення ймовірного негативного впливу частинок нанодіапазону на організм лабораторних тварин та людини. Результати цих досліджень стали підґрунтям для виникнення нового розділу токсикології — нано-

токсикології [10]. Вважають, що причиною змін у стані здоров'я працюючих можуть бути ультрадисперсні частинки, які надходять до організму інгаляційним шляхом [12, 14, 15]. Зокрема, передбачається, що навіть короткострокові впливи частинок нанодіапазону, що є присутніми в атмосферному повітрі та повітрі робочої зони, можуть бути причиною різноманітних порушень з боку серцево-судинної системи [8, 18, 20] та органів респіраторного тракту (наприклад порушення легеневого кліренсу, хронічні запальні процеси, фіброз легеневої тканини та пухлини легені). За умови тривалого інгаляційного впливу такі ефекти можуть виникати при впливі частинок навіть із низькою токсичністю [10, 11]. Крім того, ультрадисперсні частинки можуть індукувати пошкодження ДНК, інгібувати процеси репарації, а також здійснювати транзит металів та органічних токсикантів до клітин-мішеней [16, 19]. Ряд дослідників висловлюють припущення, що у випадках, коли впливові ультрадисперсних частинок передувала тривала експозиція частинками більшого розміру, яка обумовила виникнення патологічних змін легеневої тканини, ультрадисперсні частинки можуть накопичуватися в альвеолах, сприяючи таким чином розвитку емфіземи легень [10, 13].

Разом з тим слід зазначити, що вивчення ролі ультрадисперсних частинок у розвитку екологічно та професійно обумовлених захворювань тільки починається і здебільшого знаходиться на гіпотетичному рівні [7, 10, 17, 18]. Так, проблема, пов'язана з пошкоджувальною дією на організм людини наночастинок твердої складової зварювальних аерозолів (ТСЗА) є сьогодні хоча й надзвичайно актуальною, але вкрай недостатньо розробленою. Даних щодо гігієнічного значення таких аерозолів, а також щодо механізмів їхнього проникнення через легені, неушкоджену шкіру і т. п. до внутрішніх се-

редовищ (у кров, лімфу) з наступною пошкоджувальною дією на серцево-судинну, дихальну, імунну та інші системи й органи, недостатньо. У той же час вирішення цих питань має велике значення для розуміння ролі наночастинок зварювальних аерозолів (ЗА) як пріоритетних забруднювачів виробничого та навколишнього середовища (зокрема аерозолів важких металів, поліметалевих зварювальних аерозолів і т. д.), у формуванні патологічних порушень в організмі та в свою чергу для підвищення ефективності засобів первинної і вторинної профілактики екологічно і виробничо обумовлених захворювань, в тому числі злоякісних пухлин [1–3].

Мета даної роботи — дослідити роль частинок ТСЗА у розвитку патологічних змін у легенях та на прикладі кремнію діоксиду встановити особливості біологічної дії ультрадисперсних частинок порівняно з частинками цієї ж речовини, що не належать до нанодіапазону.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження морфологічних змін у легенях під впливом ЗА та наночастинок аморфного високодисперсного кремнезему А-450 або А-50 проведено на експериментальних тваринах (безпородні щури самці). До морфологічного дослідження увійшли 8 груп тварин віком 3–3,5 міс. Одна з них (5 тварин) не зазнала впливу будь-яких речовин і слугувала контролем. Тварини 7 інших груп (по 10 у кожній) протягом різного часу зазнали дії ЗА, наночастинок різного діаметру кремнію діоксиду або сполученого впливу цих речовин. 1-ша група — тварини після інтратрахеального введення (3 міс) ЗА УОНІ-13/45 (масова частка компонентів ТСЗА: Fe_2O_3 — 74,5%, Mn — 2,8%, Si — 3,3%, Ti — 2%, F^- (розчин. фторидів) — 4,4%, F^- (нерозчин. фторидів) — 2,2%) у дозі 50 мг/щура. 2-га група — тварини після інтратрахеального введення (4 міс) ЗА УОНІ-13/45 у дозі 50 мг/щура. 3-тя група — тварини, що зазнали поєднаної дії ЗА УОНІ-13/45 (одноразове інтратрахеальне введення, 50 мг/щура) з наступною (через 3 міс) експозицією наночастинок кремнію діоксиду А-450 (діаметр первинних частинок 6–7 нм, питома поверхня 450 м²/г) шляхом одноразового інтратрахеального введення у дозі 50 мг/щура; загальний термін експерименту 4 міс. 4-та група — тварини, що зазнали поєднаної дії ЗА УОНІ-13/45 (інтратрахеальне введення, 50 мг/щура) з наступною експозицією наночастинок кремнію діоксиду А-50 (діаметр первинних частинок 54–55 нм, питома поверхня 50 м²/г) шляхом інтратрахеального введення у дозі 50 мг/щура; схема та тривалість експерименту аналогічні таким у 3-й групі. 5-та група — тварини після інтратрахеального введення А-450 у дозі 50 мг/щура; термін експерименту 6 міс. 6-та група — тварини після інтратрахеального введення А-50 у дозі 50 мг/щура; термін експерименту 6 міс. 7-ма група — тварини після інтратрахеального введення часток природ-

ного кварцу (ПК-3) у дозі 50 мг/щура; термін експерименту 6 міс.

Забій тварин проводили згідно з Правилами роботи з лабораторними тваринами. Від кожної тварини були вилучені шматочки з обох легень (від 4 до 6), які обробляли за стандартною методикою виготовлення парафінових блоків. Гістологічні зрізи легень товщиною 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином; мікроскопічне дослідження здійснювали на мікроскопі МРІ-1.

Для визначення ступеня сенсibilізації щурів кожної з груп до пухлиноасоційованих антигенів (ПаАг) використовували метод імунодетекції (ЕФР-тест), який був розроблений в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН та Інституті медицини праці АМН України [4, 5]. ЕФР-тест відноситься до імунологічних способів виявлення ранніх стадій пухлинного процесу і являє собою модифікацію відомого тесту (Field E.J., Caspari E.A., 1970) на електрофоретичну рухливість індикаторних клітин. В ході експериментальних досліджень було використано ПаАг легені. Для аналізу зв'язку між сенсibilізацією до зазначеного антигену і впливом ЗА та наночастинок досліджуваних речовин була використана комп'ютерна програма, рекомендована ВООЗ для епідеміологічного та лікарського спостереження — Epi Info (версія 5.01a, березень 1991 р.).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, частинки різних розмірів, що є присутніми в ЗА, відрізняються за складом та структурою. Розмір частинок ТСЗА варіює досить широко: це можуть бути як частинки розміром від 100 до 400 нм, так і більш дрібні — від 10 до 20 нм. Зіставлення фізичних та фізико-хімічних характеристик ТСЗА та проявів їхньої дії дали підстави для припущення щодо «пускової» ролі ультрадисперсних частинок, з яким добре корелюють дані фахової літератури стосовно особливостей перебігу патології серцево-судинної і дихальної систем у осіб, які мають професійний контакт з аерозолями металів. Варто враховувати, що під час зварювання пари металу, нагріті до високої температури, компоненти електродного покриття або інших зварювальних матеріалів піднімаються над місцем зварювання та потрапляють у зону, температура якої відповідає температурі навколишнього повітря, тому пари швидко конденсуються і твердіють. Останнє може підвищувати ймовірність агломерації наночастинок ТСЗА, що істотно ускладнює вивчення їхньої ролі в розвитку професійно обумовлених захворювань у робітників зварювальних професій.

Припущення щодо того, що ультрадисперсні частинки володіють більшою біологічною активністю та можуть індукувати інтенсивні запальні реакції, знайшло підтвердження в порівняльному дослідженні біологічних ефектів наночастинок аморфного високодисперсного кремнезему (А-450

і А-50), а також Люберецького кварцу (ПК-3). Порівнюючи результати гістологічних досліджень після одноразового інтратрахеального введення згаданих порошків кремнезему (5-та, 6-та, 7-ма групи шурів) слід зазначити, що високодисперсні форми (А-50 і А-450) викликали більш виражені дистрофічні процеси в паренхіматозних органах (особливо частинки з діаметром 6–7 нм) порівняно з кварцем. Крім того, усі кремнеземи спричиняли подразнюючу дію на слизову оболонку бронхів, що зберігалася після введення частинок 6–7 нм протягом всього експерименту (6 міс). Загальною складовою біологічної дії всіх кремнеземів була наявність клітинної інфільтрації інтерстиціальної тканини легень, інтенсивність якої була вище при застосуванні А-450.

Припущення про те, що якщо впливу ультрадисперсних частинок передувала тривала експозиція частинками більш великого розміру, то патологічні зміни, зокрема в органах респіраторного тракту, будуть більш виразними порівняно зі змінами, спричиненими ізольованою дією як великих, так і ультрадисперсних частинок, знайшло підтвердження в результатах дослідження на лабораторних тваринах, що зазнали одноразового інтратрахеального введення ЗА УОНІ 13/45, а через 3 міс — одноразового інтратрахеального введення А-450 або А-50 (3-тя і 4-та групи шурів). Зокрема, використання методу імунодетекції дозволило встановити, що найбільшу частку тварин, сенсibilізованих до ПаАг легені, було зафіксовано у 3-й групі, експонованій ЗА та наночастинками кремнію діоксиду з аеродинамічним діаметром 6–7 нм (табл. 1).

Таблиця 1
Розподіл досліджуваних тварин за ступенем сенсibilізації до ПаАг легені

Група	Експозиція	Кількість тварин, сенсibilізованих до ПаАг легені, %
1-ша, 2-га	ЗА	10
3-тя	ЗА + А-450 (6–7 нм)	90
4-та	ЗА + А-50 (54–55 нм)	70
5-та	А-450 (6–7 нм)	60
6-та	А-50 (54–55 нм)	60
7-ма	ПК-3	10
Контроль	–	10

Дані, отримані за допомогою методу імунодетекції, дозволили зробити розрахунки значень сумарного відносного ризику розвитку (МНRR) злویакісних новоутворень (табл. 2).

Таблиця 2
Сумарний відносний ризик (МНRR) розвитку раку у досліджуваних тварин

Експозиція	МНRR (за сенсibilізацією до ПаАг легені)
ЗА + А-450 (6–7 нм)	7,5 (1,97 < МНRR < 28,61, p < 0,005)
ЗА + А-50 (54–55 нм)	6,5 (1,68 < МНRR < 25,16, p < 0,005)

Як видно, найбільша величина сумарного відносного ризику була отримана для групи тварин, експонованої ЗА та А-450. Сумарний відносний ризик у тварин, які зазнали впливу ЗА та А-50, був дещо нижчим. Також було розраховано значення віднос-

ного ризику розвитку (RR) злویакісних новоутворень легені для груп досліджуваних тварин (табл. 3).

Таблиця 3
Відносний ризик (RR) розвитку злویакісних новоутворень легені у досліджуваних тварин

Експозиція	RR
А-450 (6–7 нм)	6,00 (0,87 < RR < 41,22, p < 0,05)
А-50 (54–55 нм)	6,00 (0,87 < RR < 41,22, p < 0,05)
ЗА + А-450 (6–7 нм)	9,00 (1,39 < RR < 58,45, p < 0,05)
ЗА + А-50 (54–55 нм)	7,00 (1,04 < RR < 46,95, p < 0,05)

Відносний ризик розвитку онкопатології легені у групах тварин, експонованих тільки частинками кремнезему з аеродинамічним діаметром як 6–7 нм, так і 54–55 нм, був однаковим та становив 6,00. Для групи тварин, експонованих ЗА та А-450, RR = 9,00, а для групи тварин, які зазнали впливу ЗА та А-50, RR = 7,00. Слід зазначити, що відносний ризик, близький до одиниці, свідчить про відсутність впливу досліджуваного фактора/факторів на розвиток захворювання. Чим більше величина ризику перевищує одиницю, тим більше даний фактор може впливати на виникнення порушень стану здоров'я. Отже, поєднана дія ЗА та наночастинок кремнію діоксиду сприяє підвищенню ризику розвитку несприятливих змін в організмі лабораторних тварин, зокрема ризику розвитку злویакісних новоутворень легені. У той же час канцерогенний ризик значно підвищується і у випадку експозиції тварин наночастинками кремнезему з найменшим аеродинамічним діаметром (6–7 нм). Одержані експериментальні дані обґрунтовують, що високий рівень захворюваності електрозварників може бути обумовлений не тільки токсичністю компонентів ЗА, а й здатністю ультрадисперсних частинок (аеродинамічний діаметр < 100 нм) до глибокого проникнення до тканин організму та накопичення в них.

ВИСНОВКИ

1. На прикладі високодисперсних аморфних кремнеземів підтверджено, що ультрадисперсним частинкам притаманна більш висока біологічна активність та пошкоджувальна дія порівняно з частинками цієї ж речовини, що не належать до нанодіапазону.

2. Біологічна активність навіть ультрадисперсних частинок суттєво варіює в залежності від розміру — частинки кремнію діоксиду з аеродинамічним діаметром 6–7 нм зумовлюють більш виразні патологічні зміни в організмі лабораторних тварин (шурів), ніж частинки цієї ж речовини з аеродинамічним діаметром 54–55 нм.

3. Патологічні зміни, зумовлені ультрадисперсними частинками, є більш виразними, якщо їхньому впливу передують експозиції частинками більш великих розмірів (аеродинамічний діаметр > 100 нм), при цьому тенденція щодо зростання пошкоджувальної дії частинок з аеродинамічним діаметром 6–7 нм порівняно з частинками з аеродинамічним діаметром 54–55 нм зберігається.

4. Поєднана дія частинок ТСЗА та наночастинок кремнію діоксиду сприяє підвищенню ризи-

ку розвитку несприятливих змін в організмі лабораторних тварин, зокрема ризику розвитку злоякісних новоутворень легені. В той же час сумарний відносний канцерогенний ризик суттєво підвищується і у випадку експозиції тварин тільки наночастинками кремнезему з найменшим аеродинамічним діаметром (6–7 нм).

5. Удосконалення заходів щодо профілактики захворювань, які можуть бути зумовлені впливом нано- та субмікронних аерозолів виробничого середовища, можливе лише за умов подальшої розробки проблеми; не виключено, що накопичення нових даних може стати підґрунтям для перегляду існуючих гігієнічних нормативів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горбань ЛН. Об адекватности мер защиты сварщиков уровню профессионального риска, обусловленного воздействием сварочных аэрозолей. Гигиена труда 2003; **1** (Вып 34): 98–110.
2. Горбань ЛН, Краснюк ЕП, Факторов ИВ. Влияние условий труда на состояние здоровья и заболеваемость работающих в сварочном производстве. Гигиена труда 1983; (Вып 19): 40–9.
3. Дейнега ВГ. Професійні хвороби. Київ: Вища школа, 1993. 232 с.
4. Демецкая АВ, Горбань ЛН, Новиченко НЛ и др. Применение метода иммунодетекции для оценки риска развития профессионального рака у работающих, подвергавшихся воздействию потенциально токсичных и канцерогенноопасных химических веществ. Современ пробл токсикол 2003; (1): 91–4.
5. Демецкая АВ, Новиченко НЛ, Горбань ЛН. Применение способа иммунодетекции рака как метода доклинической диагностики при выявлении групп профессионального риска. Гигиена труда 2001; (Вып 32): 297–302.
6. Чуйко АА. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Киев: Наук думка, 2003: 10–68.
7. Brouwer DH, Gijsberg JH, Lurvink MW. Personal exposure in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. Ann Occup Hyg 2004; **48** (5): 439–53.
8. Delfino R, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particles mass and cardiovascular health. Environ Health Perspect 2005; **113** (8): 934–46.
9. Donaldson K, Ston V. Current hypotheses on mechanisms of toxicity of ultrafine particles. Ann Inst Super Sanita 2003; **39** (3): 405–9.
10. Donaldson K, Ston V, Tran CL, et al. Nanotoxicology. Occup Environ Med 2004; **61**: 727–8.
11. Kaewamatawong T, Kawamura N, Okajima M, et al. Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice. Toxicol Pathol 2005; **33** (7): 745–51.
12. Pope CA, Dockery DW, Spengler JD, Raizenne ME. Respiratory health and PM 10 pollution. A daily time series analysis. Am Rev Respir Dis 1995; **151**: 669–74.
13. Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. Lancet 1995; **345**: 176–8.

14. Shulz H. Fine particulate matter — a health hazard for lungs and other organs? Pneumologie 2006; **60** (10): 611–5.

15. Takenaka S, Karg E, Kreyling WG. Distribution pattern of unhaled ultrafine gold particles in the rat lung. Inhal Toxicol 2006; **18** (10): 733–40.

16. Tobias HJ, Beving DE, Ziemann PJ. Chemical analysis of diesel engine nanoparticles using a nano-DMA/thermal desorption particle beam mass spectrometer. Environ Sci Technol 2001; **35** (11): 2233–43.

17. Weissing V, Whiteman KR, Torchilin VP. Accumulation of protein-loaded long-circulating micelles and liposomes in subcutaneous Lewis lung carcinoma in mice. Pharm Res 1998; **15** (10): 1552–6.

18. Wold LE, Simkhovich BZ, Kleinman MT. In vivo and vitro models to test the hypothesis of particle-induced effects on cardiac function and arrhythmias. Cardiovasc Toxicol 2006; **6** (1): 69–78.

19. Xu Z, Gautam M, Mehta S. Cumulative frequency fit for particle size distribution. Appl Occup Environ Hyg 2002; **17** (8): 538–42.

20. Yue W, Schneider A, Stolzel M, et al. Ambient source-specific particles are associated with prolonged repolarization and increased levels of inflammation in male coronary artery disease patients. Mutat Res 2007; **621** (1–2): 50–60.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF NANOPARTICLES DEPENDING ON THEIR SIZE

Y.I. Kundiev, O.V. Demetska, T.K. Kucheruk,
V.O. Movchan, N.L. Novichenko, L.A. Naleskina

Summary. *Basing on literature data and on the analysis of personal experimental material it is supposed that nanoparticles, occurring in the working zone air, can cause the increase of morbidity and mortality as a result of pathological changes in the respiratory and cardiovascular systems. In particular, it is supposed that high rates of morbidity in electric welders is conditioned not only by toxicity of components of welding aerosols, but by their small particles, that can deeply penetrate into tissues. On the basis of the data of personal experimental studies the assumption is varified on the increase of biological activity of substances, presenting in the form of nanoparticles. In particular, it was established that the toxicity of substances of low toxicity (amorphous SiO₂) increased substantially, when they are in the form of ultradisperse particles.*

Key Words: nanoparticles, ultradisperse particles, welding aerosols, amorphous SiO₂ of high dispersity.

Адреса для листування:

Кундієв Ю.І.
01033, Київ, вул. Саксаганського, 75
Інститут медицини праці АМН України
E-mail: yik@nanu.kiev.ua