

УДК 615.9

# СУБХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Л.П. Точилкина, Н.В. Ходыкина,  
Л.Ю. Бочарова, М.С. Срослов,  
В.В. Клаучек, Б.Н. Филатов

ФГУП «Научно-исследовательский институт  
гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА  
России, 400048, г. Волгоград, Российская  
Федерация

**В**опыте на беспородных белых крысах самцах изучена системная токсичность наночастиц диоксида церия в форме 0,078 М гидрозоля. Установлено, что двухмесячное пероральное поступление в организм нанодиоксида церия в дозах 50, 10 и 2 мг/кг сопровождается развитием дозозависимого резорбтивного токсического эффекта. Доза 2 мг/кг квалифицирована как порог общего токсического действия в субхроническом эксперименте.

**Ключевые слова:** диоксид церия, наночастицы, гидрозоль, крысы, токсичность, пороговая доза.

**Введение.** Несмотря на чрезвычайное разнообразие современного рынка наноматериалов, к разряду приоритетных причислено не более двух десятков [1, 2, 3]. Относящийся к ним нанодиоксид церия (НДЦ) представляет отдельный интерес как неорганический антиоксидант, обладающий выраженной кислородной нестехиометрией, способностью к быстрой регенерации и ферментомиметическими свойствами, которые в совокупности превращают его в перспективного кандидата для применения в медицине с целью лечения широкого круга заболеваний [4, 5, 6, 7]. Между тем в вопросе о безопасности потенциального терапевтического применения нанодиоксида церия нет полной ясности ввиду противоречивости взглядов на его токсичность и, в особенности, скудности определённых для него параметров токсикометрии [8, 9, 10, 11, 12].

Как показали собственные исследования с внутрибрюшинным введением 0,01 М гидрозоля, в остром опыте нанодиоксиду церия присуща широкая зона биологической активности и дозовая зависимость возникающих эффектов. На максимальном уровне воздействия (80 мг/кг)

наносоединение вызывает негативные длительно сохраняющиеся изменения как на системном, так и на организменном уровне, однако смертельного отравления не развивается. Пороговая доза общего токсического действия (L<sub>imacint</sub>) составила 0,8 мг/кг [13]. Было сделано заключение, что поиск показаний к терапевтическому применению гидрозоля НДЦ в дозе ниже 1 мг/кг для коррекции нарушений, обусловленных активацией перекисного окисления, может оказаться перспективным направлением дальнейших исследований его фармакологической активности. При этом представлялось логичным обращение к субхроническому режиму экспонирования, которое, во-первых, отвечало общепринятой схеме этапности работ по гигиеническому нормированию химических веществ, во-вторых, определялось его оптимальной продолжительностью для выявления возможных полезных фармакологических свойств, в-третьих, обеспечивало преимущество собственным ранее начатым исследованиям. По этим соображениям количественная оценка токсического эффекта нанодиоксида церия в условиях

**Точилкина Людмила Петровна (Tochilkina Lyudmila Petrovna)**, кандидат медицинских наук, ст. научный сотрудник, заведующий лабораторией лекарственной безопасности ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» (НИИГПП) ФМБА России, 400048, г. Волгоград, Российская Федерация, tochilkina@rihtop.ru;

**Ходыкина Нина Владимировна (Khodykina Nina Vladimirovna)**, кандидат биологических наук, вед. научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» (НИИГПП) ФМБА России, 400048, г. Волгоград, Российская Федерация, hodykina@rihtop.ru;

**Бочарова Людмила Юрьевна (Bocharova Lyudmila Yur'evna)**, научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» (НИИГПП) ФМБА России, 400048, г. Волгоград, Российская Федерация, BocharovaLY@mail.ru;

**Срослов Михаил Сергеевич (Sroslov Mikhail Sergeevich)**, научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» (НИИГПП) ФМБА России, 400048, г. Волгоград, Российская Федерация, SroslovMS@gmail.com;

**Клаучек Валентина Васильевна (Klauchek Valentina Vasil'evna)**, доктор медицинских наук, зам. директора по научной работе ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» (НИИГПП) ФМБА России, 400048, г. Волгоград, Российская Федерация, klauchek@rihtop.ru;

**Филатов Борис Николаевич (Filatov Boris Nikolaevich)**, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» (НИИГПП) ФМБА России, 400048, г. Волгоград, Российская Федерация, filatov@rihtop.ru

субхронического эксперимента и стала *целью настоящей работы*.

**Материалы и методы исследования.** Объектом экспериментального исследования являлись образцы высокодисперсного 0,078° М золя диоксида церия, синтезированные в Институте общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова (РАН, Москва) и охарактеризованные там же с применением методов УФ-видимой спектроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, рентгенофазового анализа и динамического светорассеяния. Согласно результатам анализа, синтезированные золи были монодисперсны, содержали сферические наночастицы со средним гидродинамическим размером (радиусом) 3,5 нм в количестве  $1,9 \times 10^{23}$  мл<sup>-1</sup> и сохраняли стабильность не менее 1-2 месяцев. Препаратом сравнения служил церий оксид (IV) ЧДА СТП ТУ КОМП 2-532-12 с массовой долей оксида церия 99,5 % (ДЦ).

Изучение системной токсичности проводили в двухмесячном субхроническом опыте на беспородных белых крысах самцах при в/ж способе введения наноматериала в трёх дозах – 50, 10 и 2 мг/кг (опыт 1, 2 и 3 соответственно). Для оценки последствий его применения использовали 2 группы – контрольную и подвергавшуюся воздействию макроаналога – ДЦ традиционной дисперсности (опыт 4). При работе с наногидрозолема маточные образцы разводили до расчётной концентрации деионизированной водой. Макроаналог апплицировали в/ж в виде сонифицированной водной суспензии в дозе 2 мг/кг. Самцы контрольной группы получали деионизированную воду. Объём вводимой жидкости составлял 1 мл на 100,0 г массы тела.

Численность групп составляла 22 особи. Через месяц по 10 из них выводили из эксперимента для промежуточного обследования и завершающей эвтаназии, 60 оставшихся (по 12 в группе) обследовали и умерщвляли в конце эксперимента.

О биологической активности НДС судили по характеру, глубине и динамике изменений показателей, характеризующих функциональное состояние целостного организма, общий уровень обмена веществ, особенности регуляции основных метаболических путей и эффективность механизмов антиперекисной защиты.

Функциональное состояние организма анализировали с применением интегральных тестов: масса тела; ЧСС, мышечная сила, поведенческие реакции (в автоматизированной системе регистрации и идентификации поведенческих актов «LABORAS», «Metris», Нидерланды), морфологический состав крови.

Нарушения метаболизма оценивали на основании анализа изменений основных биохими-

ческих показателей сыворотки крови, включавших содержание общего белка, альбумина, глюкозы, триглицеридов, холестерина, мочевины, креатинина, общего билирубина, молочной и пировиноградной кислот, активность АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТ, ЩФ и ХЭ. Состояние механизмов антиперекисной защиты организма оценивали по содержанию восстановленного глутатиона в цельной крови и конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) – в сыворотке. Исследования выполняли с применением биохимического анализатора «Chem Well 2910», («Combi», США) или унифицированными спектрофотометрическими методами.

Биологический материал, полученный на некропии животных (головной мозг, сердце, лёгкие, печень, селезёнку, почки, надпочечники, семенники), обследовали макроскопически и использовали для определения коэффициентов массы внутренних органов. В конце эксперимента печень, селезёнку и гонады подвергали гистологическим исследованиям по общепринятой схеме.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением критерия t Стьюдента-Фишера [14], используя пакет Primer of Biostatistics 4.03. Различия считали достоверными при  $P \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Ежедневное наблюдение за животными не обнаружило у них явных признаков соматического неблагополучия. Инструментальное обследование подтвердило, что сдвиги на уровне целостного организма у самцов малочисленны. Изменения массы тела, контролируемые еженедельно, были связаны с приближением к возрастному пику физиологической зрелости, нежели обусловлены контактом с НДС: достоверные межгрупповые различия по данному показателю отсутствовали. Независимо от продолжительности экспозиции, гидрозолема не вызывал хронотропного эффекта и не снижал силу мышечной хватки. Отклонения со стороны поведения были минимальными и развивались только после введения НДС в максимальной и промежуточной дозах. В первой половине эксперимента они ограничивались слабовыраженными признаками двигательной гиперактивности, на которую в опыте 1 (50 мг/кг) указывало увеличение длительности перемещений (до  $29,09 \pm 2,66$  сек. против  $21,20 \pm 2,67$  сек. в контроле), в опыте 2 (10 мг/кг) – возрастание на 81 % времени перемещений с максимальной скоростью ( $168,58 \pm 22,44$  сек. в сравнении с  $92,92 \pm 25,36$  сек. в контроле). К концу эксперимента эти сдвиги либо нивелировались, как это наблюдали в первой опытной группе, либо меняли направленность на прямо противоположные, как во второй опытной

группе, где регистрировали двукратное сокращение прежде повышенного времени перемещений с максимальной скоростью ( $65,17 \pm 15,54$  сек. при  $134,42 \pm 28,96$  сек. в контроле).

В большей мере проявилось действие наногидрозоля на морфологический состав периферической крови. Результаты промежуточного обследования свидетельствовали, что НДС при введении в дозах 50 и 10 мг/кг, не оказывая влияния на белый кровяной росток, вызывал глубокие изменения в составе красной крови. У подопытных животных регистрировали выраженную эритропению со снижением содержания эритроцитов в опыте 1 – до  $(8,00 \pm 0,16) \times 10^{12}/л$  и в опыте 2 – до  $(7,81 \pm 0,18) \times 10^{12}/л$  по сравнению с  $(8,40 \pm 0,04) \times 10^{12}/л$  в контроле. В обоих случаях отличия опыта от контроля были не только достоверными, но и выходили за пределы бисигмального диапазона его возможных колебаний. Эритропении сопутствовала гипогемоглобинемия, когда в тех же группах концентрация гемоглобина была ниже контрольного уровня ~ на 6,5 %. Помимо этого, в опыте 2 обнаруживали тромбоцитопению: при содержании кровяных пластинок в крови контрольных животных, равном  $(700,50 \pm 20,27) \times 10^9/л$ , их количество у животных второй группы составляло только  $(639,30 \pm 15,12) \times 10^9/л$ .

Возможно, выявленные гематологические сдвиги были обусловлены токсическим угнетением процессов кроветворения. Однако равновероятно и то, что они явились следствием гиперспленизма. Как известно, селезёнка в отношении кровообращения и кроветворения выполняет важные контрольные функции. Её считают и «депо» крови, и «кладбищем» форменных элементов [15, 16], и потому особый интерес вызывает тот факт, что анемия у животных первой и второй опытных групп сопровождалась достоверным увеличением (в опыте 1 – с выходом за  $2\sigma$  контроля) относительной массы селезёнки – соответственно до  $5,18 \pm 0,36$  г/кг и  $4,69 \pm 0,15$  г/кг при контрольном значении показателя  $4,14 \pm 0,14$  г/кг. Важно отметить, что продление контакта с НДС до двух месяцев приводило к нивелированию отмеченных гематологических нарушений. Более того, в третьей группе, где дозовая нагрузка наночастицами была наименьшей из испытуемых, в конце эксперимента обнаружился некий эффект стимуляции кроветворения в виде повышения содержания в периферической крови количества эритроцитов – до  $(8,37 \pm 0,13) \times 10^{12}/л$  относительно  $(7,80 \pm 0,23) \times 10^{12}/л$  в контроле. Примечательно то, что обратное развитие анемического синдрома, зарегистрированное при финишном обследовании животных первой и второй опытных групп (50 и 10 мг/

кг НДС), происходило на фоне инверсии гравиметрической характеристики селезёнки. Её относительная масса в первой группе не просто нормализовалась, но в сравнении с контролем ( $4,44 \pm 0,16$  г/кг) оказалась достоверно сниженной ( $3,94 \pm 0,13$  г/кг), во второй группе изменения были аналогичны (снижение до  $3,93 \pm 0,44$  г/кг), но имели лишь характер чётко выраженной тенденции.

Таким образом, сравнение патофизиологических сдвигов, выявленных у подопытных животных при промежуточном и финальном обследовании, указывает на возникновение в организме наряду с токсическими эффектами НДС процессов адаптации к ним. Косвенным свидетельством их весьма напряжённого характера, возможно, является снижение относительной массы надпочечников, выявленное в конце эксперимента во всех четырёх группах: при относительной массе органа в контроле, равной  $0,174 \pm 0,004$  г/кг, в опыте 1-4 данный показатель составлял соответственно  $0,157 \pm 0,006$ ;  $0,145 \pm 0,008$ ;  $0,152 \pm 0,010$  и  $0,151 \pm 0,008$  г/кг.

В ходе обоих обследований у всех подопытных животных, получавших наночастицы, наблюдали и немногочисленные изменения ряда биохимических параметров, при этом дозозависимый характер воздействия НДС на обмен веществ определялся не столько количеством и глубиной, сколько направленностью обнаруженных отклонений (табл. 1, 2).

В первую очередь, следует отметить разнонаправленность изменений уровня восстановленного глутатиона в крови. Так, у крыс, получавших НДС в высшей дозе (50 мг/кг), при первом тестировании достоверного отклонения его содержания от контроля не выявлено, а при продлении экспозиций до двух месяцев отмечалось снижение на 16 %, что является плохим прогностическим признаком и указывает на функциональную недостаточность системы антиперекисной защиты организма. У крыс второй группы (10 мг/кг) умеренный (на 9 %) рост восстановленного глутатиона, зарегистрированный в середине эксперимента на фоне роста (до 123 %) мочевины, к окончанию опыта сменился падением, выраженным в той же степени, что и в первой группе. И только животные, экспонированные НДС в низшей дозе (третья группа), отреагировали на его поступление стойким адаптивным повышением показателя (на 11 % и 17 % через один и два месяца соответственно) (табл. 1, 2).

Со стороны белкового обмена при первом обследовании отмечено значимое снижение альбумина в сыворотке крыс первой группы ( $34,28 \pm 0,67$  г/л при  $36,26 \pm 0,42$  г/л у параллельного контроля), возможно, определяемое его связыванием поступающими в кровяное русло

Таблица 1

**Биохимические показатели крови крыс после однемесячного перорального  
воздействия диоксида церия**

Показатели и единицы измерения	Группы животных				
	Опыт 1, НДЦ 50 мг/кг	Опыт 2, НДЦ 10 мг/кг	Опыт 3, НДЦ 2 мг/кг	Опыт 4, ДЦ 2мг/кг	контроль
1	2	3	4		
АСТ, Е/л	187,7±11,1	171,3±11,8	196,0±11,0	216,5±16,9	200,8±9,4
АЛТ, Е/л	75,6±7,4	87,9±6,2	79,4±4,7	84,0±5,5	89,5±5,2
ЛДГ, Е/л	503,1±61,4	396,3±24,0	421,6±59,4	451,8±61,1	472,6±48,6
ГГТ, Е/л	11,64±0,87	10,12±0,82	9,36±0,77	9,20±0,60	10,96±0,66
ЩФ, Е/л	454,7±40,0*	565,2±66,8	581,0±47,1	639,3±75,3	745,8±69,9
ХЭ, Е/л	377,1±17,8	421,1±20,1*	416,8±19,9*	371,6±15,9	362,6±13,6
Альбумин, г/л	34,28±0,67*	35,57±0,38	35,45±0,31	34,99±0,57	36,26±0,42
Общий белок, г/л	78,83±1,59	82,08±0,95	81,20±1,38	80,36±1,05	82,45±1,41
Триглицериды, ммоль/л	0,813±0,074	0,952±0,117	0,792±0,033*	1,067±0,110	0,910±0,041
Холестерин, ммоль/л	2,050±0,127	2,094±0,129	1,846±0,075	2,006±0,093	1,892±0,080
Мочевина, ммоль/л	4,752±0,477	5,502±0,354*	4,404±0,267	4,578±0,344	4,471±0,238
Креатинин, мкмоль/л	32,39±1,83	36,94±1,99	35,05±1,71	34,23±1,67	35,13±1,41
Глюкоза, ммоль/л	4,368±0,124	4,000±0,132	4,248±0,129	4,302±0,205	4,021±0,137
Молочная кислота, ммоль/л	5,472±0,519	5,012±0,391	4,484±0,297*	5,198±0,316	5,550±0,291
ПВК, мкмоль/л	44,11±2,10	43,77±1,74	45,71±2,63	46,82±2,92	47,46±2,22
Молочная кислота/ПВК	122,70±7,62	114,19±7,46	99,38±4,21**	111,74±3,92	116,81±1,86
Билирубин, мкмоль/л	12,18±0,35	12,28±0,25	12,43±0,23	12,47±0,39	12,18±0,16
Восстановленный глутатион, мкмоль/л	1,058±0,026	1,131±0,028*	1,156±0,013*	1,105±0,038	1,038±0,025
МДА, мкмоль/л	12,09±0,42	11,51±0,45	11,33±0,50	11,78±0,35	12,46±0,40
Ca <sup>2+</sup> , ммоль/л	2,505±0,067	2,568±0,044	2,474±0,039	2,523±0,043	2,538±0,035
Хлориды, ммоль/л	111,36±0,94	110,95±0,85	111,05±0,35	110,96±0,44	110,38±0,36

Примечание: \* – обозначены достоверные сдвиги,

\*\* – достоверные сдвиги, выходящие за пределы диапазона физиологических ( $M \pm 2\sigma$ ) колебаний параллельного контроля

наночастицами [17]. На более низких уровнях воздействия НДЦ указанный эффект исчезал, а в третьей группе к окончанию эксперимента наблюдалось достоверное (до 105 %) повышение общего белка, связанное, очевидно, с активацией синтеза.

Энзимологические исследования сыворотки крови выявили у крыс первой группы

значимые отклонения активности ЩФ. При этом установленное через месяц от начала опыта ингибирование фермента (на 39 %) в последующем сменялось его столь же выраженной (на 42 %) активацией с сопутствующим падением концентрации ионов кальция ( $2,244 \pm 0,054$  ммоль/л при  $2,412 \pm 0,042$  ммоль/л в контроле), в обмене которых указанный

**Биохимические показатели крови крыс после двухмесячного перорального воздействия диоксида церия**

Показатели и единицы измерения	Группы животных				
	Опыт 1, НДЦ 50 мг/кг	Опыт 2, НДЦ 10 мг/кг	Опыт 3, НДЦ 2 мг/кг	Опыт 4, ДЦ 2мг/кг	контроль
1	2	3	4		
АСТ, Е/л	187,1±8,5	218,8±18,2	183,8±8,3	184,2±9,7	189,5±14,5
АЛТ, Е/л	86,3±5,0	86,3±5,9	100,4±6,0	89,3±6,6	93,0±7,4
ЛДГ, Е/л	425,9±46,0	465,5±84,1	505,8±41,7	438,6±57,2	435,2±58,5
ГГТ, Е/л	10,14±1,16	10,38±0,496	10,93±0,751	10,11±1,02	11,93±0,53
ЩФ, Е/л	556,8±55,9*	382,4±28,9	409,5±26,3	42525±38,2	391,0±27,4
ХЭ, Е/л	481,8±26,9	497,8±33,9	434,0±14,7	451,3±18,8	464,7±20,2
Альбумин, г/л	34,53±0,41	33,75±0,53	34,28±0,45	33,54±0,45	33,19±0,62
Общий белок, г/л	75,62±0,65	76,16±0,73	79,34±0,73*	78,03±1,13	75,57±0,93
Триглицериды, ммоль/л	0,658±0,038	0,656±0,037	0,666±0,016	<u>0,595±0,026</u>	0,608±0,035
Холестерин, ммоль/л	1,642±0,069	1,648±0,063	1,706±0,061	1,604±0,111	1,633±0,069
Мочевина, ммоль/л	4,426±0,258	4,695±0,274	4,583±0,191	4,730±0,242	4,260±0,339
Креатинин, мкмоль/л	39,27±1,15	42,25±1,42	40,35±2,30	41,15±2,17	41,73±1,56
Глюкоза, ммоль/л	5,472±0,177	5,325±0,255	5,501±0,173	6,000±0,178	5,663±0,191
Молочная кислота, ммоль/л	2,876±0,166	3,003±0,226	2,936±0,137	2,737±0,117	3,040±0,248
ПВК, мкмоль/л	43,79±1,62	48,43±2,30	48,35±1,35	45,13±1,22	46,75±1,70
Молочная кислота/ПВК	65,99±3,64	61,54±3,29	60,88±2,80	63,12±2,51	62,22±3,20
Билирубин, мкмоль/л	10,01±0,46	10,61±0,91	11,40±0,39	10,47±0,30	10,94±0,53
Восстановленный глутатион, мкмоль/л	1,101±0,071*	1,094±0,050*	1,532±0,072*	<u>1,218±0,078</u>	1,309±0,064
МДА, мкмоль/л	10,88±0,48	11,09±0,58	10,44±0,24	10,86±0,31	10,88±0,23
Ca <sup>2+</sup> , ммоль/л	2,244±0,054*	2,359±0,061	2,386±0,062	2,467±0,039	2,412±0,042
Хлориды, ммоль/л	109,32±0,45	109,88±0,67	108,59±0,63	109,93±0,73	110,05±0,61

Примечание: \* – обозначены достоверные сдвиги,

\*\* – достоверные сдвиги, выходящие за пределы диапазона физиологических ( $M \pm 2\sigma$ ) колебаний параллельного контроля

фермент принимает непосредственное участие [18]. В этой связи нельзя исключить ни повреждающего действия наночастиц на клетки желчных протоков, ни нарушений на-

ночастицами метаболизма костной ткани.

У крыс, получавших НДЦ в средней и низшей дозах, энзимологические сдвиги проявлялись умеренной (на 15 %) активацией ХЭ в середине

Таблица 3

**Комплексно-схематическая оценка достоверных сдвигов,  
выявленных в субхроническом эксперименте**

Достоверно изменённые показатели	Группы животных и сроки обследования, месяцы							
	НДЦ						ДЦ	
	опыт 1		опыт 2		опыт 3		опыт 4	
	50 мг/кг		10 мг/кг		2 мг/кг		2 мг/кг	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Физиологические								
Длительность передвижений	↑	-	-	-	-	-	-	-
Время перемещений с максимальной скоростью	-	-	↑	↓	-	-	-	-
Гематологические								
Эритроциты	↓↓	-	↓↓	-	-	↑	-	-
Гемоглобин	↓	-	↓	-	-	-	-	-
Тромбоциты	-	-	↓	-	-	-	-	-
Биохимические								
ЩФ	↓	↑	-	-	-	-	-	-
ХЭ	-	-	↑	-	↑	-	-	-
Альбумин	↓	-	-	-	-	-	-	-
Общий белок	-	-	-	-	-	↑	-	-
Триглицериды	-	-	-	-	↓	-	-	-
Мочевина	-	-	↑	-	-	-	-	-
Молочная кислота	-	-	-	-	↓	-	-	-
Лактат/пируват	-	-	-	-	↓↓	-	-	-
Восстановленный глутатион	-	↓	↑	↓	↑	↑	-	-
Ca <sup>2+</sup>	-	↓		-	-	-	-	-
Относительная масса внутренних органов								
Селезёнка	↑↑	↓	↑	-	-	-	-	-
Надпочечники	-	↓	-	↓	-		-	↓
Достоверных сдвигов	6	5	8	3	5	4	0	1
Из них сдвигов, выходящих за ±2σ контроля	2	0	1	0	1	0	0	0
Суммарное количество достоверных изменений	11 (2)		11 (1)		9 (1)		1 (0)	

Примечание: ↑ и ↓ – направленность достоверных сдвигов;

↑↑ и ↓↓ – направленность достоверных сдвигов, выходящих за пределы диапазона колебаний параллельного контроля (их общее число заключено в скобки)

эксперимента (табл. 1). Адаптивный характер данной реакции представляется вполне обоснованным. Известно, что рост активности холинэстераз обнаруживается при различных стрессовых воздействиях, отражая способность холинергических систем к адаптации к изменившимся условиям. Включение адаптационных механизмов в ответ на ежедневное поступление в организм НДЦ проявлялось и изменениями на уровне регуляции процессов энергообеспечения, имевшими место только у животных, получавших нанопрепарат в низшей дозе (2 мг/кг). При первом тестировании (1 месяц) в сыворотке крыс третьей группы зарегистрировано статистически значимое снижение концентрации молочной кислоты (на 19 %), сопровождавшееся достоверным (с выходом за  $M \pm 2\sigma$  параллельного контроля) падением отношения лактат/пируват ( $99,38 \pm 4,21$  против  $116,81 \pm 1,86$  в контрольной группе) и триглицеридов (до 87 %) (табл. 1). Направленность указанных отклонений свидетельствует в пользу повышения скорости и эффективности энергетического обмена. К окончанию эксперимента отмеченные показатели нормализовались (табл. 2). Обращает на себя внимание, что на протяжении всего эксперимента у крыс группы сравнения, экспонированных макроаналогом, на уровне, соответствующем низшему уровню воздействия НДЦ (2 мг/кг), никаких значимых метаболических сдвигов не выявлено (табл. 1, 2).

Таким образом, плановые тестирования животных продемонстрировали, что субхроническое внутрижелудочное поступление наночастиц диоксида церия не было безразлично для их организма, на что указывали обнаруженные в ходе эксперимента функциональные сдвиги, в схематическом виде отражённые в таблице 3.

Формальный анализ табличных данных мог бы привести к выводу, что все три выбранные для испытаний дозовые уровни НДЦ, несмотря на 5-кратный разрыв между ними, являются едва ли не изотоксичными: суммарное количество достоверных сдвигов, выявленных в 1-3 опытных группах, находится практически на одном уровне. Однако ошибочность подобного умозаключения убедительно доказывают принципиальные различия в характере и динамике нарушений, возникших после введения НЧ ДЦ в разных дозах. Так, большинство гомеостатических сдвигов, развивавшихся на максимальном уровне воздействия НДЦ 50 мг/кг, носили безусловно вредный характер. К их числу, несомненно, следует отнести анемию, спленомегалию, гипоальбуминемию, функциональную недостаточность системы антиперекисной защиты организма и опосредованное ЩФ вмешательство в кальциевый обмен. В условиях же длительного контакта с НДЦ в средней дозе 10 мг/кг стало возможным возник-

новение, наряду с аналогичными токсическими эффектами той же выраженности (анемия, спленомегалия), изменений негативных, но более умеренных (истощаемость системы антиперекисной защиты организма) и даже сдвигов, относимых к адаптивным (повышение активности ХЭ). При снижении дозовой нагрузки на организм ещё в 5 раз (до 2 мг/кг) адаптивный характер приобрели уже практически все выявленные изменения, к числу которых следует отнести стимуляцию эритропоэза, активацию белкового синтеза и повышение эффективности энергетического обмена. Таким образом, зависимость характера наблюдавшихся сдвигов от уровня экспозиции наночастицами вполне очевидна.

Таким образом, результаты дифференцированной оценки последствий применения диоксида церия в разных дозах и опора на принятые в профилактической токсикологии критерии вредности [19] дают основания признать уровни НДЦ 50 и 10 мг/кг действующими, дозу 2 мг/кг – пороговой по общетоксическому эффекту.

Значимость и патогенетическое сходство единственного (!) возникшего после воздействия макроаналога (ДЦ традиционной дисперсности) нарушения с наблюдавшимися при применении НДЦ (снижение относительной массы надпочечников) препятствуют квалификации его дозы 2 мг/кг как недействующей и побуждают рассматривать и её как пороговую.

**Заключение.** В Российской Федерации разработана целостная структурированная система многоуровневой оценки безопасности и контроля наноматериалов на всех стадиях жизненного цикла [20]. Профильные методические документы закрепляют принцип «каскадности» испытаний, и место, цель и задачи субхронического эксперимента в схеме токсиколого-гигиенической оценки наноматериалов чётко обозначены. Вместе с тем очевидно, что это не исключает возможности альтернативного использования представленных материалов, например, для расчёта референтных доз НДЦ и уточнения фармакотерапевтической ценности активирующих эффектов его низкоуровневых воздействий.

#### **Выводы.**

1. Наночастицы диоксида церия диаметром ~ 7 нм при длительном внутрижелудочном введении в дозах 50, 10 и 2 мг/кг оказывают на крыс самцов общее токсическое действие, не вызывая грубых патоморфологических нарушений. Пороговая доза по системному эффекту установлена на уровне 2 мг/кг.

2. На пороговом уровне воздействия (2 мг/кг) модифицирующее влияние НДЦ на функциональный статус организма в сравнении с ДЦ традиционной дисперсности носит более выраженный характер.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические рекомендации МР 1.2.2641-10. Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
2. Методические рекомендации МР 1.2.0037-11. Контроль наноматериалов в воздухе. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.
3. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012; 14 (9): 1109-1120.
4. Kyosseva S.V., McGinnis J.F. Cerium oxide nanoparticles as promising ophthalmic therapeutics for the treatment of retinal diseases. *World J. Ophthalmol*. 2015; 5(1): 23-30.
5. Щербakov А. Б., Жолобак Н. М., Иванов В. К., Третьяков Ю. Д., Спивак Н. Я. Наноматериалы на основе диоксида церия: свойства и перспективы использования в биологии и медицине. *Биотехнология Acta*. 2011; 4 (1): 9-28.
6. Estevez A. Y., Erlichman J. S. The potential of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) for neurodegenerative disease therapy. *Nanomedicine*. 2014; 9 (10): 1437-40.
7. Иванов В.К., Щербakov А.Б., Баранчиков А.Е., Козик В.В. Нанокристаллический диоксид церия: свойства, получение, применение. Томск; 2013.
8. Tseng M.T., Lu X., Duan X., Hardas S.S., Sultana R., Wu P. et al. Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2012; 260 (2): 173-82.
9. Спивак Н.Я., Носенко Н.Д., Жолобак Н.М., Щербakov А. Б., Резников А. Г., Иванова О. С. и др. Нанокристаллический диоксид церия повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самцов крыс. Наносистемы: физика, химия, математика. 2013; 4 (1): 72-7.
10. Ramesh A., Ratla N. N., Indukuri R., Venkatesh K., Rao S.T. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the cerium oxide nanoparticles in Wistar rats. *International Journal of Phytopharmacology*. 2014; 5 (1): 46-50.
11. Poma A., Ragnelli A.M., de Lapuente J., Ramos D., Borrás M., Aimola P. et al. In vivo inflammatory effects of ceria nanoparticles on CD-1 mouse: evaluation by hematological, histological, and TEM analysis. *J. Immunol. Res*. 2014. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/361419/> (accessed 8 August 2016).
12. Ефименко Е.Ю., Савченко Ю.А., Фалалеева Т.М., Береговая Т.В., Щербakov О.Б., Иванов В.К. и др. Изменения моторной функции желудка и толстой кишки у крыс под влиянием нанокристаллического диоксида церия. *Физиологический журнал*. 2014; 60 (3): 67-74.
13. Срослов М.С., Точилкина Л.П., Филатов Б.Н., Ходыкина Н.В. Экспериментальное изучение острой токсичности наночастиц диоксида церия. В сб.: *Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы: Материалы научной конференции*. Волгоград, 2014; 58-9.
14. Глотов Н.В., ред. *Биометрия: Учебное пособие*. Л.: ЛГУ; 1982.
15. Селезенка, её функции. Available at: <http://www.komykak.ru/analiz/selezenka.html> (accessed 9 August 2016).
16. Сапин М.П., Ревазов В.С. Селезенка и костный мозг. *Здоровье*. 1984; 10. Available at: <http://lechebnik.info/503/12.htm> (accessed 9 August 2016).
17. Song L. Sorption of Bovine Serum Albumin on Nano and Bulk Oxide Particles: Masters Theses 1896. Paper 391. Massachusetts; 2014. Available at: <http://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1475&context=theses> (accessed 10 August 2016).
18. Анализ крови на щелочную фосфатазу. Available at: <http://myfamilydoctor.ru/analiz-krovi-na-shhelochnyuyu-fosfatazu/> (accessed 10 August 2016) (in Russian).
19. Саноцкий И.В., Уланова И.Л. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. М.: Медицина; 1975.
20. Онищенко Г.Г., Тутельян И.В., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Развитие системы оценки безопасности и контроля наноматериалов и нанотехнологий в Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2013; (1): 4-11.
21. Анализ крови на щелочную фосфатазу. Available at: <http://myfamilydoctor.ru/analiz-krovi-na-shhelochnyuyu-fosfatazu/> (in Russian).
16. Sapin M.R., Revazov V.S. Spleen and bone marrow. *Zdorov'e*. 1984; 10. Available at: <http://lechebnik.info/503/12.htm> (accessed 9 August 2016) (in Russian).
17. Song L. Sorption of Bovine Serum Albumin on Nano and Bulk Oxide Particles: Masters Theses 1896. Paper 391. Massachusetts; 2014. Available at: <http://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1475&context=theses> (accessed 10 August 2016).
18. Blood alkaline phosphatase test. Available at: <http://myfamilydoctor.ru/analiz-krovi-na-shhelochnyuyu-fosfatazu/> (accessed 10 August 2016) (in Russian).
19. Sanotskiy I.V., Ulanova I.L. Criteria of harmfulness in hygiene and toxicology for assessment of chemical compounds hazard. M.: Meditsina; 1975 (in Russian).
20. Onishchenko G.G., Tutel'yan I.V., Gmoshinskiy I.V., Khotimchenko S.A. Development of safety evaluation system and control of nanomaterials and nanotechnology in Russian Federation. *Gigiena i sanitariya*. 2013; (1): 4-11 (in Russian).

## REFERENCES:

1. Metodicheskie rekomendatsii MP 1.2.2641-10. Determination of priority types of nanomaterials in environmental objects, living organisms and foods. M.: Federal'nyy Tsentri gijieny i epidemiologii Rospotrebнадзора, 2010 (in Russian).
2. Metodicheskie rekomendatsii MP 1.2.0037-11. Control of nanomaterials in air. M.: Federal'nyy Tsentri gijieny i epidemiologii Rospotrebнадзора, 2010 (in Russian).
3. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012; 14 (9): 1109-1120.
4. Kyosseva S.V., McGinnis J.F. Cerium oxide nanoparticles as promising ophthalmic therapeutics for the treatment of retinal diseases. *World J. Ophthalmol*. 2015; 5(1): 23-30.
5. Shcherbakov A. B., Zholobak N. M., Ivanov V. K., Tret'yakov Yu. D., Spivak N. Ya. Nanomaterials based on the nanocrystalline ceric dioxide: properties and use perspectives in biology and medicine. *Biotechnologia Acta*. 2011; 4 (1): 9-28 (in Russian).
6. Estevez A. Y., Erlichman J. S. The potential of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) for neurodegenerative disease therapy. *Nanomedicine*. 2014; 9 (10): 1437-40.
7. Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., Baranchikov A.E., Kozik V.V. Nanocrystalline cerium dioxide: properties, preparation, application. Tomsk; 2013 (in Russian).
8. Tseng M.T., Lu X., Duan X., Hardas S.S., Sultana R., Wu P. et al. The changes of the motor function of the stomach and the colon under the action of the nanocrystalline cerium dioxide. *Fiziol. Zh*. 2014; 60 (3): 67-74 (in Russian).
9. Spivak N.Ya., Nosenko N.D., Zholobak N.M., Shcherbakov A. B., Reznikov A. G., Ivanova O. S. et al. The nanocrystalline cerium dioxide raises the functional activity of genesial system of ageing males of rats. *Nanosistemy: fizika, khimiya, matematika*. 2013; 4 (1): 72-7 (in Russian).
10. Ramesh A., Ratla N. N., Indukuri R., Venkatesh K., Rao S.T. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the cerium oxide nanoparticles in Wistar rats. *International Journal of Phytopharmacology*. 2014; 5 (1): 46-50.
11. Poma A., Ragnelli A.M., de Lapuente J., Ramos D., Borrás M., Aimola P. et al. In vivo inflammatory effects of ceria nanoparticles on CD-1 mouse: evaluation by hematological, histological, and TEM analysis. *J. Immunol. Res*. 2014. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/361419/> (accessed 8 August 2016).
12. Iefimenko O.Yu., Savchenko I.O., Falalyeyeva T.M., Beregova T.V., Shcherbakov O.B., Ivanov V.K. et al. The changes of the motor function of the stomach and the colon under the action of the nanocrystalline cerium dioxide. *Fiziol. Zh*. 2014; 60 (3): 67-74 (in Russian).
13. Sroslov M.S., Tochilkina L.P., Filatov B.N., Khodykina N.V. Experimental study for assessment of chemical compounds acute toxicity. In: *Nanotoxicology: achievements, problems and prospects: Materials of scientific conference*. Volgograd, 2014; 58-9 (in Russian).
14. Glotov N.V., ed. *Biometriya: Textbook*. L.: LGU; 1982 (in Russian).
15. Spleen, its function. Available at: <http://www.komykak.ru/analiz/selezenka.html> (accessed 9 August 2016) (in Russian).

L.P. Tochilkina, N.V. Khodykina, L.Yu. Bocharova, M.S. Sroslov, V.V. Klauchek, B.N. Filatov

## SUB-CHRONIC TOXICITY OF NANOSIZED CERIUM DIOXIDE

Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, 400048 Volgograd, Russian Federation

In an experiment on white male rats, systemic toxicity of cerium dioxide nanoparticles in the form of 0.078 M hydrosol was studied. It is found out that a two-month intake of cerium nano dioxide in doses of 50, 10 and 2 mg / kg was followed by the development of toxic dose-dependent resorptive effect. The dose of 2 mg / kg was qualified as a threshold of general toxic effect in sub-chronic experiment.

**Keywords:** cerium dioxide, nanoparticles, hydrosol, rats, toxicity, threshold dose.

Материал поступил в редакцию 18.11.2016 г.