ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

ОРИГІНАЛЬНІ СТАТТІ

УДК [546.723-31- 022.532: 615.9]: 57.084 https://doi.org/10.33573/ujoh2020.04.251

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЗАЛІЗА НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ ЗА УМОВИ ОДНОРАЗОВОГО ІНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ

Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М., Короленко Т. К., Легкоступ Л. А., Лагутіна О. С., Козлов К. П., Бакало Л. В.

Державна установа «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва Національної академії медичних наук України», м. Київ

Вступ. Оксиди заліза (Fe_2O_3, Fe_3O_4) у вигляді нанодисперсій є перспективним матеріалом для промисловості, медицини й фармації. Наночастинки (НЧ) оксиду заліза можуть потрапляти в організм людини з повітрям, їжею та ліками. Наявність особливих фізико-хімічних властивостей у НЧ (ультрамалий розмір, велика площа поверхні, підвищена реактивність і біологічна дія) потребують ґрунтовних досліджень з оцінки їхньої безпечності. Важливим питанням є дослідження поведінки НЧ, а саме: транспорт, розподілення, вплив на роботу органів і систем за умови короткочасного та тривалого надходження в організм.

Мета дослідження – експериментальне дослідження впливу колоїдних розчинів Fe_2O_3 різної дисперсності на організм щурів за умови одноразового інтратрахеального введення.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на 24 щурах-самцях Wistar масою 220–260 г, розподілених на 2 дослідні групи, яким одноразово інтратрахеально вводили колоїдні розчини Fe_2O_3 з частинками 19 нм і 400 нм у дозі за залізом 10 мг/кг, контрольній групі у той самий спосіб вводили 0,9 % фізіологічний розчин. На 21-у добу експерименту щурів знеживлювали, визначали масу тіла та органів, гематологічні показники (загальний аналіз крові з підрахунком субпопуляцій лейкоцитів, коагулограми), біохімічні показники, що характеризують стан печінки, нирок, білкового та ліпідного обмінів, неспецифічного природного імунітету.

Результати. Встановлено, що одноразове інтратрахеальне введення щурам колоїдних розчинів Fe_2O_3 не впливало на інтегральні показники – масу тіла та органів. Введення розчину Fe_2O_3 з частинками 19 нм спричинило незначне збільшення вмісту заліза в легенях, тимусі та нирках, а Fe_2O_3 з частинками 400 нм викликало достовірне підвищення концентрації заліза в легенях, печінці, селезінці, тимусі та нирках порівняно з показниками в контрольній групі. Зміни гематологічних показників у піддослідних щурів характеризувались зниженням рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів, абсолютної кількості лімфоцитів і гранулоцитів, збільшенням рівня цинкпротопорфірину й відсотка моноцитів. Ці дані вказують на розвиток анемії та активацію клітин неспецифічного природного імунітету. Встановлене підвищення кількості тромбоцитів, фібриногену та протромбінового індексу, зниження тромбінового часу в щурів дослідних груп свідчить про вплив Fe_2O_3 на процес зсідання крові. Визначені підвищені рівні С-реактивного білка та циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів дослідних груп можуть бути ознаками формування запального процесу в організмі.

Висновки. Накопичення заліза в органах (серце, печінка, селезінка, нирки) щурів дослідних груп після одноразового інтратрахеального введення розчину Fe_2O_3 з частинками 400 нм свідчить про їхню підвищену акумуляційну здатність. Визначені порушення клітинного та білкового складу крові вказують на потенційну гематотоксичну, прозапальну та атерогенну дію, особливо НЧ Fe_2O_3 19 нм.

Ключові слова: колоїдні розчини оксиду заліза (Fe_2O_3), інтратрахеальне введення, токсичність, безпечність

Вступ

Залізо та його оксиди складають основну частину твердої фази полютантів, що можуть надходити в організм людини в умовах виробництва, зокрема, видобутку, збагаченні та переробці залізної руди, виплавці сталей, феросплавів і чавуну, обробці металів, зварюванні залізних конструкцій [1, 2].

Встановлено, що аерозолі (пил, дим), що містять оксиди заліза при довготривалій дії спричиняють відкладення заліза в легенях і викликають сидероз – різновид пневмоконіозу в працюючих і населення

© Колектив авторів, 2020

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

промислових міст, можливий також розвиток бронхітів та емфіземи легень [3].

Відомо, що за умови хронічного перенасичення організму залізом відбувається підвищення швидкості перекисного окиснення ліпідів клітин, що зумовлює їхнє ушкодження. Одночасно спостерігається стимуляція синтезу колагену ліпоцитами печінки, що зумовлює утворення сполучної тканини (фіброз) в уражених органах, причому цей процес є незворотним і зумовлює органну недостатність [4, 5].

Отже, проблема токсичності заліза та його оксидів є однією з актуальних для профілактичної медицини та промислової токсикології.

На особливу увагу заслуговують наночастинки (НЧ) оксидів заліза (Fe_2O_3, Fe_3O_4), які активно використовуються в різних галузях господарства. Створені на їхній основі наноматеріали є перспективними для медицини, зокрема, діагностики та лікування онкологічних захворювань, створенні протианемічних лікарських засобів [6–8]. Безпосередній контакт людини з НЧ оксидів заліза може відбуватись на етапі їхнього синтезу, використання та утилізації. Наявність особливих фізико-хімічних властивостей для НЧ (ультрамалиий розмір, велика площа поверхні, підвищена реактивність і біологічна дія) потребують ґрунтовних досліджень їхньої безпечності. Важливими є дослідження поведінки НЧ оксидів заліза в організмі, а саме: транспорт, розподілення між органами, вплив на роботу органів і систем за умови короткочасного та тривалого надходження.

Проведені дослідження показали, що інгаляційний вплив НЧ Fe_3O_4 розміром 22 нм і 280 нм на щурів лінії Sprague Dawley в дозах за залізом 0,8 і 20,0 (мг/кг) викликав індукцію активних форм кисню в клітинах, гіперплазію і фіброз тканини легенів, а також порушення системи зсідання крові [9].

Інтратрахеальне введення НЧ магнетиту (Fe_3O_4) розміром 10 нм і 50 нм сприяло їхньому накопиченню в макрофагах і нейтрофілах легень та органах, багатих клітинами ретикуло-ендотеліальної системи. Більш виразні зміни в печінці щурів були визначені після введення НЧ Fe_3O_4 50 нм [10] .

При дослідженні гострої токсичності НЧ Fe_3O_4 на щурах встановлено, що вони проявляли токсичну дію в дозах, що перевищують 400 мг/кг. При вивченні їхньої хронічної токсичності виявлено збільшення активності ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ) у крові та цитоморфологічні зміни в печінці [11].

У наших попередніх дослідженнях встановлено, що НЧ Fe_2O_3 розміром 19 нм і 75 нм за умови тривалого введення в черевну порожнину щурів чинили токсичну дію на органи-мішені (серце, печінка, нирки, підшлункова залоза), про що свідчили дистрофічні та некробіотичні зміни в клітинах цих органів, порушення біохімічних показників – маркерів ураження клітин [12].

Не дивлячись на збільшення кількості експериментальних досліджень, присвячених безпечності НЧ оксидів заліза на організм, основні прояви та механізми їхнього несприятливого впливу залишаються остаточно не з'ясованими.

Мета дослідження – експериментальне дослідження впливу колоїдних розчинів Fe_2O_3 різної дисперсності на організм щурів за умови одноразового інтратрахеального введення.

Матеріали та методи дослідження

Колоїдні розчини Fe_2O_3 були отримані методом хімічного синтезу та стандартизовані за масовою часткою заліза 10 мг/л, що відповідає гранично допустимій концентрації (ГДК) у повітрі робочої зони. Середній розмір дрібних частинок дорівнював 19 нм, а крупних – 400 нм. Таким чином, за однакової масової концентрації заліза колоїди Fe_2O_3 відрізнялись між собою розміром частинок.

Експеримент проведено на 24 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar з початковою масою 220–260 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні та вільному доступі до водогінної води. Тварини були розподілені на 3 групи по 10 у кожній. Щурам 1-ї дослідної групи одноразово в трахею під ефірним наркозом вводили 0,5 мл колоїдного розчину Fe_2O_3 з розміром частинок 19 нм. У такий самий спосіб 2-й дослідній групі вводили розчин Fe_2O_3 з частинками 400 нм, контрольним тваринам (3-я група) вводили 0,5 мл 0,9 % фізіологічного розчину. Кров і внутрішні органи в щурів забирали під час декапітації під легким ефірним наркозом на 21-у добу експерименту. Усі маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням положень «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.), схвалених Комітетом з біоетики НАН України [13].

У контрольних і дослідних щурів визначали інтегральні показники токсичності – масу тіла та від-

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

носну масу органів. Аналіз крові виконано за допомогою гематологічного аналізатора Elite 3 (Чехія), концентрацію цинкпротопорфірину (ЦПП) вимірювали на гемафлюориметрі 206Д (США), показники коагулограми визначали на приладі HUMACLOT Junior (Німеччина). Серед біохімічних показників крові досліджували: активність ферментів АЛТ, АСТ, лужної фосфатази (ЛФ); вміст глюкози, сечової кислоти, ліпідів (холестерин, тригліцериди) за допомогою біохімічного аналізатора Key-Lab (Італія) і тест-наборів «RANDOX» (Велика Британія). У сироватці крові визначали вміст С-реактивного білка тест-набором «Філісіт-Діагностика» (Україна) і циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у реакції преципітації з поліетиленгліколем (ПЕГ) М = 6000 (ЦІК високомолекулярних – з 3,5% ПЕГ, ЦІК низькомолекулярних – з 7,0 % ПЕГ) на аналізаторі Sunrise Tecan (Австрія) [14]. Концентрацію заліза в органах контрольних і дослідних щурів вимірювали на Спектрометрі енергій рентгенівського випромінювання ElvaX CEP-01 (Україна).

Статистичний аналіз отриманих даних виконано з використанням програми Microsoft Excel, розраховано середнє арифметичне, середнє відхилення, похибку середнього арифметичного. Вірогідність відмінності показників розраховували за критеріями Стьюдента й Манна-Уїтні [15].

Результати дослідження та їх обговорення

Одноразове інтратрахеальне введення дослідним щурам колоїдних розчинів Fe_2O_3 з частинками 19 нм і 400 нм у дозі за залізом 10 мг/кг маси тіла суттєво не вплинуло на інтегральні показники токсичності. Достовірних відмінностей маси тіла та відносної маси внутрішніх органів піддослідних тварин порівняно з контрольними не встановлено.

Результати вимірювання вмісту заліза в органах показали, що одноразове інтратрахеальне введення колоїдного розчину Fe_2O_3 19 нм спричинило збільшення вмісту заліза в легенях, тимусі та нирках, але воно було статистично не достовірне. Після введення щурам розчину Fe_2O_3 з частинками 400 нм концентрація заліза була достовірно збільшеною в легенях, печінці, селезінці, тимусі та нирках порівняно з показниками в контрольній групі (рисунок).

Вимірювання гематологічних показників показало, що в дослідних групах щурів після введення колоїдних розчинів Fe_2O_3 було встановлено зниження концентрації гемоглобіну та кількості еритроцитів, підвищення рівня ЦПП. У щурів, яким вводили Fe_2O_3 400 нм, спостерігали тільки підвищення середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті (табл. 1).

У щурів після введення Fe_2O_3 19 нм порівняно з контрольною групою визначено тенденцію до зниження кількості лейкоцитів ($p < 0,1$). В обох дослідних групах визначено зниження абсолютної кількості лімфоцитів і гранулоцитів, збільшення відсотка моноцитів (табл. 2).

За даними літератури основними механізмами гематотоксичної дії важких металів вважаються порушення еритропоезу, процесу синтезу гему та глобіну (особливо α-ланцюга), мембрано- та цитотоксична дія, що призводить до зниження тривалості життя клітин крові та їхніх морфофункціональних змін [16]. Встановлені порушення в складі крові можуть вказувати на ймовірний вплив НЧ Fe_2O_3 на процес синтезу гему та активацію клітин моноцитарного ряду.

Однією з чутливих до негативного впливу хімічних чинників є багатокомпонентна система регуляції агрегатного стану крові, яка представлена сукупністю функціонально-морфологічних і біохімічних механізмів, що забезпечують гемостаз і підтримують рідкий стан крові в судинах. Провідна роль у здійсненні первинного гемостазу належить тромбоцитам, їхня активація є одним з пускових механізмів тромбоутворення. Механізм зсідання крові складний та залежить від багатьох факторів. Окрім тромбоцитів у підтримці агрегатного стану крові, зокрема, процесі утворення фібринового згустку в каскаді біохімічних реакцій беруть участь білки плазми крові, стан цього процесу дозволяє оцінити коагулограма [17].

Досліджено, що інтратрахеальне введення щурам колоїдних розчинів Fe_2O_3 викликало незначне підвищення кількості тромбоцитів ($p < 0,1$), достовірне збільшення фракції великих тромбоцитів (показник PLCC) і тромбокриту ($p < 0,05$) (табл. 2). Підвищення показника PLCC у крові може свідчити про збільшення кількості «незрілих» тромбоцитів і розглядатись як маркер їхньої активації, а також як гематологічне порушення, що спостерігається при різних мієлопроліферативних захворюваннях. Підвищені значення тромбокриту в дослідних щурів за введення Fe_2O_3 можуть розглядатись як ознака ризику розвитку тромбозу судин.

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

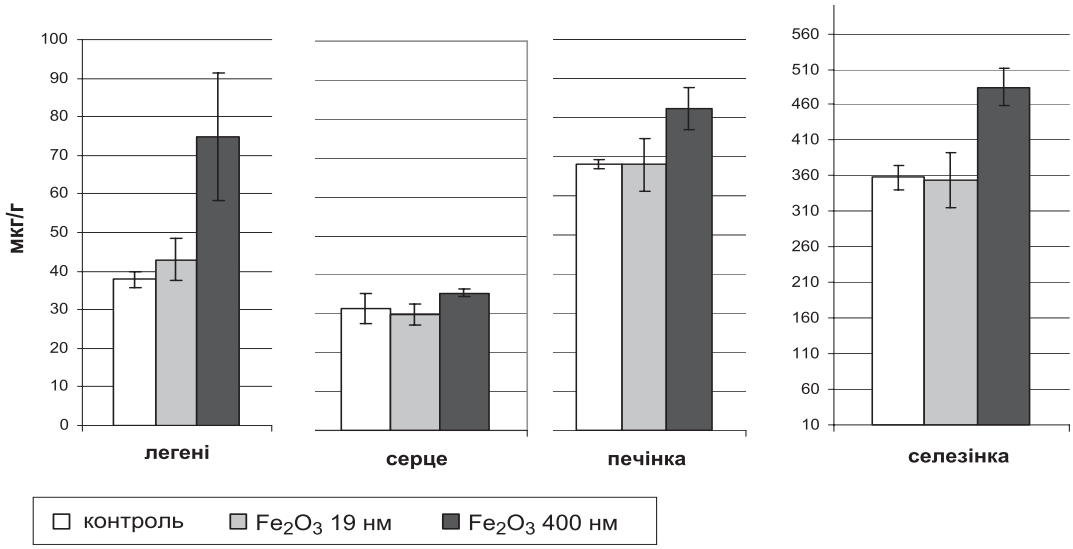

Рисунок. Концентрація заліза (мкг/г) в органах контрольних і дослідних щурів після одноразового інтратрахеального введення колоїдних розчинів оксиду заліза (Fe_2O_3)

Результати визначення показників коагулограми показали, що після одноразового інтратрахеального введення піддослідним щурам колоїдних розчинів Fe_2O_3 19 нм і 400 нм були встановлені зміни порівняно з контрольною групою. Як у 1-й, так і в 2-й дослідних групах визначено достовірне підвищення рівня фібриногену (у 2,7 разу) і зниження майже вдвічі тромбінового часу ($p < 0,05$ порівняно з контролем). У групі тварин, яким вводили Fe_2O_3 400 нм, було встановлено достовірне збільшення протромбінового індексу та незначне зниження показника активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ) (табл. 2).

Як відомо, фібриноген — це фактор згортання крові I, що виробляється в печінці, завдяки дії активних ферментів плазми крові він перетворюється в фібрин, який бере участь в утворенні кров'яного згустку та тромбу. Фібриноген є також білком гострої фази, його концентрація в крові підвищується при захворюваннях, що супроводжуються пошкодженням тканин і запаленням. Отже, встановлені підвищені рівні фібриногену в крові обох дослідних груп щурів, яким вводили колоїдні розчини Fe_2O_3, можуть вказувати на їхній вплив на кінцевий етап зсідання крові (утворення фібрину з фібриногену), а також на розвиток запального процесу. На активацію утворення тромбів може вказувати збільшення протромбінового індексу, особливо після введення Fe_2O_3 400 нм. За впливу обох розчинів Fe_2O_3 тромбіновий час скоротився вдвічі до (7,95 ± 0,16) с у 1-й групі та до (7,40 ± 0,21) с у 2-й дослідній групі порівняно з контролем з (14,16 ± 2,35) с. Ці дані можуть вказувати на те, що введення Fe_2O_3 може підвищувати ризик тромбоутворення (табл. 2).

Слід зауважити, що отримані нами результати кореспондують із даними літератури, які свідчать про те, що НЧ оксиду заліза можуть викликати зміни в системі регуляції агрегатного стану крові. Так, вони можуть виступати як регулятори швидкості ферментативної реакції зсідання крові, в одному випадку прискорюючи її, а в іншому — пригнічуючи [18].

За результатами біохімічних досліджень після введення піддослідним щурам колоїдного розчину Fe_2O_3 з НЧ 19 нм і 400 нм мало місце підвищення активності ферменту АСТ (на 22,3 % і 15,7 % відносно контролю). Активність ферменту АЛТ у дослідних групах не відрізнялась від значення в контрольній групі щурів. Суттєвих відмінностей активності ЛФ у щурів, яким вводили розчини Fe_2O_3 19 нм і 400 нм порівняно з контролем не встановлено (табл. 3).

Як відомо, активність трансаміназ у сироватці крові є одним з найцінніших і найпоширеніших у клінічній практиці показників ураження печінки. Отримані нами дані вказують на відсутність розвитку патологічного процесу в печінці після одноразового введення розчинів Fe_2O_3, тоді як підвищення активності АСТ можна пояснити їхньою можливою токсичною дією на клітини міокарда.

Слід відзначити, що після одноразового інтратрахеального введення $Fe_2O_3$19 нм і 400 нм не спо-

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

Таблиця 1

Показники периферичної крові щурів після одноразового інтратрахеального введення розчинів оксиду заліза (Fe_2O_3) 19 нм і 400 нм, M ± m

Показник	Група щурів		
	контрольна	з Fe_2O_3 19 нм	з Fe_2O_3 400 нм
Цинкпротопорфірин, мМоль/Моль гему	70,75 ± 4,38	135,63 ± 2,58*	110,75 ± 4,40*
Концентрація гемоглобіну, г/л	176,67 ± 2,57	162,50 ± 3,86	160,88 ± 3,64*
Кількість еритроцитів, 10^{12}/л	9,86 ± 0,16	9,92 ± 0,81	9,07 ± 0,23*
Середній об'єм еритроциту, мкм^3	48,17 ± 0,76	51,43 ± 2,58	46,0 ± 0,61
Середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	17,76 ± 0,20	19,11 ± 1,00	17,82 ± 0,15
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, г/л	371,50 ± 2,72	372,25 ± 7,41	386,13 ± 3,64*
Гематокрит, %	47,59 ± 0,75	48,80 ± 1,57	47,59 ± 0,75
Кількість лейкоцитів, 10^9/л	16,72 ± 0,77	13,36 ± 1,08+	13,83 ± 2,03
Кількість лімфоцитів, 10^9/л	7,88 ± 0,66	5,71 ± 0,40+	7,04 ± 1,15
Відсоток лімфоцитів, %	40,38 ± 2,15	44,11 ± 3,26	37,69 ± 4,02
Кількість моноцитів, 10^9/л	1,81 ± 0,33	2,58 ± 0,53	2,83 ± 0,81
Відсоток моноцитів, %	10,26 ± 0,62	14,03 ± 1,00$^+$	17,50 ± 4,58*
Кількість гранулоцитів, 10^9/л	9,25 ± 0,84	5,88 ± 0,32*	6,71 ± 0,01*
Відсоток гранулоцитів, %	48,67 ± 3,22	48,51 ± 6,80	47,28 ± 4,20
Кількість тромбоцитів,10^3/мкл	379,67 ± 25,70	427,50 ± 91,56	407,52 ± 47,04
Тромбокрит, %	0,13 ± 0,03	0,24 ± 0,04*	0,21 ± 0,02*
Середній об'єм тромбоцитів, км^3	5,78 ± 0,14	5,86 ± 0,31	5,91 ± 0,23
Показник гетерогенності тромбоцитів (PDWs)	6,80 ± 0,26	7,39 ± 0,53	8,01 ± 0,50*
Показник гетерогенності тромбоцитів (PDWc)	35,19 ± 0,82	35,64 ± 0,89	35,79 ± 0,76
Фракція великих тромбоцитів, %	41,83 ± 5,14	65,23 ± 8,58*	61,50 ± 8,65*

*Примітка. *Достовірна відмінність (p < 0,05) показників у дослідних групах щурів порівняно з контрольною, +тенденція до змін (p < 0,1).*

Таблиця 2

Зміни показників коагулограми щурів після одноразового інтратрахеального введення колоїдних розчинів оксиду заліза (Fe_2O_3) 19 нм і 400 нм, M±m

Показник	Група щурів		
	контрольна	з Fe_2O_3 19 нм	з Fe_2O_3 400 нм
Фібриноген, мг/дл	258,44 ± 8,75	744,40 ± 56,44*	709,40 ± 37,77*
Протромбіновий час, с	18,28 ± 1,34	15,95 ± 0,25	16,35 ± 0,41
Протромбіновий індекс, %	55,34 ± 1,19	57,80 ± 1,50	68,40 ± 3,86*
Активований частковий тромбопластиновий час, с	19,90 ± 1,22	19,54 ± 0,26	17,76 ± 0,82
Тромбіновий час, с	14,16 ± 2,35	7,95 ± 0,16*	7,40 ± 0,21*

*Примітка. *Достовірна відмінність (p < 0,05) показників у дослідних групах щурів порівняно з контрольною.*

стерігали суттєвих змін вмісту загального білка, альбуміну, сечової кислоти та креатиніну порівняно з показниками в контрольній групі щурів (табл. 3). Це свідчить про збереження білкового та пуринового обміну, а також функції нирок у піддослідних тварин. При дослідженні впливу колоїдних розчинів Fe_2O_3 на показники ліпідного обміну також не встановлено суттєвих зрушень. Так, у групі щурів,

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

Таблиця 3

Зміни біохімічних показників крові піддослідних щурів після одноразового інтратрахеального введення колоїдних розчинів оксиду заліза (Fe_2O_3) 19 нм і 400 нм, M ± m

Показник	Група щурів		
	контрольна	з Fe_2O_3 19 нм	з Fe_2O_3 400 нм
Аспартатамінотрансфераза, О/л	223,37 ± 7,68	273,19 ± 19,82*	258,45 ± 17,50*
Аланінамінотрансфераза, О/л	140,30 ± 13,76	144,0 ± 15,08	138,60 ± 39,78
Лужна фосфатаза, О/л	498,76 ± 43,32	556,87 ± 67,13	568,93 ± 53,91
Загальний білок, г/л	67,58 ± 2,98	68,22 ± 3,29	65,86 ± 0,90
Сечова кислота, мкмоль/л	5,76 ± 0,36	5,51 ± 0,04	5,44 ± 0,01
Креатинін, мкмоль/л	60,14 ± 3,42	55,46 ± 3,53	56,23 ± 4,38
Загальний холестерин, ммоль/л	5,95 ± 0,10	5,85 ± 0,28	6,12 ± 0,21
Ліпопротеїни високої щільності, ммоль/л	1,52 ± 0,05	1,62 ± 0,06	1,51 ± 0,04
Ліпопротеїни низької щільності, ммоль/л	4,14 ± 0,10	3,95 ± 0,23	4,32 ± 0,20
Тригліцериди, ммоль/л	0,59 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,64 ± 0,02
Коефіцієнт атерогенності	2,93 ± 0,12	2,61 ± 0,13	3,05 ± 0,13
Високомолекулярні циркулюючі імунні комплекси, од. опт. густ	0,017 ± 0,002	0,034 ± 0,001*	0,066 ± 0,006**
Низькомолекулярні циркулюючі імунні комплекси, од. опт. густ	0,036 ± 0,004	0,103 ± 0,009*	0,144 ± 0,008**

*Примітка. *Достовірна відмінність $p < 0,05$, **$p < 0,001$ показників у дослідних групах щурів порівняно з контрольною.*

яким вводили Fe_2O_3 400 нм визначено несуттєве зростання рівня загального холестерину (на 2,86 %) і тригліцеридів (на 8,30 %), ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) (на 4,17 %) порівняно з контролем, тоді як рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) у сироватці крові відповідав контрольним значенням. Коефіцієнт атерогенності, який визначали за формулою КА = (загальний холестерин – ЛПВЩ)/ЛПВЩ) у контрольній групі щурів становив (2,93 ± 0,12), у 1-й дослідній групі щурів дорівнював (2,61 ± 0,13), а в 2-й – (3,05 ± 0,13), що може свідчити про незначну атерогенну дію Fe_2O_3 400 нм (табл. 3).

Результати визначення концентрації С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові дослідних щурів показали, що після введення НЧ Fe_2O_3 19 нм вміст СРБ > 12 мг/л, а Fe_2O_3 400 нм СРБ > 6 мг/л, у контрольних тварин СРБ < 6 мг/л. Оскільки СРБ є високочутливим маркером і активним учасником гострої фази запалення, підвищення його рівня в сироватці крові обох дослідних груп щурів може вказувати на розвиток незначного запального процесу.

Відомо, що утворення імунних комплексів (антиген-антитіло) є результатом гуморальної імунної відповіді організму на надходження чужорідних антигенів і важливим механізмом, який забезпечує їхнє видалення. За фізіологічних умов імунні комплекси деякий час циркулюють у крові, після чого відбувається їхня елімінація. Одночасно з цим ЦІК середньої та низької молекулярної маси можуть накопичуватись у судинах. Це, у свою чергу, зумовлює посилену агрегацію та адгезію тромбоцитів, призводить до порушення мікроциркуляції крові та облітерації судин мікроциркуляторного русла, пошкодження та некрозу тканин [19].

Через 21 добу після одноразового інтратрахеального введення щурам розчину Fe_2O_3 19 нм встановлено збільшення рівня ЦІК високо- і низькомолекулярних у 2,0 і 2,9 разу відповідно ($p < 0,05$ до контролю), тоді як після введення Fe_2O_3 400 нм концентрація ЦІК високо- і низькомолекулярних достовірно зросла (у 3,9 і 4,0 разу, $p < 0,001$ порівняно з даними в контрольній групі). Отже, збільшені рівні низькомолекулярних ЦІК у сироватці крові дослідних щурів можуть розглядатись як тригерний фактор, що запускає патологічні реакції – запалення та автоімунний процес.

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

Висновки

1. Одноразове інтратрахеальне введення колоїдного розчину Fe_2O_3 з НЧ 19 нм (у дозі за залізом 10 мг/кг, що відповідає ГДК у повітрі робочої зони) через 21 добу спричинило незначне збільшення вмісту заліза в легенях, тимусі та нирках, а Fe_2O_3 400 нм достовірне підвищення заліза в легенях, печінці, селезінці, тимусі та нирках порівняно з показниками в контрольній групі.
2. Встановлені зміни гематологічних показників у піддослідних щурів після введення Fe_2O_3 19 нм і 400 нм такі, як зниження рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів, збільшення рівня ЦПП, можуть вказувати на порушення процесу синтезу гему та гемоглобіну. Зниження абсолютної кількості лімфоцитів і гранулоцитів, збільшення відсотка моноцитів вказує на активацію клітин неспецифічного природного імунітету.
3. Активація тромбоцитів, підвищені рівні фібриногену та протромбінового індексу, зниження тромбінового часу в дослідних щурів свідчать про вплив НЧ Fe_2O_3 19 нм і 400 нм на активацію процесу зсідання крові.
4. Визначені біохімічні показники свідчать про те, що колоїдні розчини Fe_2O_3 19 нм і 400 нм при одноразовому інтратрахеальному введенні чинили незначний токсичний вплив на внутрішні органи дослідних щурів.
5. Підвищені рівні СРБ і ЦІК у сироватці крові щурів можуть бути ознаками розвитку запального процесу в організмі, який стимулювало введення колоїдних розчинів Fe_2O_3, особливо з НЧ 19 нм.

Література

1. Нариси з токсикології важких металів. Випуск V – Залізо; за заг. ред. акад. НАМНУ І. М. Трахтенберга. Київ : ВД «Авіцена», 2017. 88 с. ISBN 978-966-2144-96-3.

2. Albretsen Jay. The toxicity of iron, an essential element. *Veterinary Medicine,* 2006. V. 2. P. 82–90.

3. Лубянова И. П. Избыточное железо и патология у рабочих сварочных профессий: под общей ред. акад. Ю. И. Кундиева. Киев : ВД «Авіцена», 2013. 240 с. ISBN 978-966-2144-59-8.

4. Patel R. R, Yi E. S., Ryu J. H. Systemic iron overload associated with Welder's siderosis. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2009. V. 337 (1). P. 57–59. https://doi.org/10.1097/01.MAJ.0000308933.80112.49.

5. Ghio A. J. Disruption of iron homeostasis and lung disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009. V. 1790 (7). P. 731–739. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.11.004.

6. Дудченко Н. О. Магнітні наночастинки медико-біологічного призначення: методи синтезу, дослідження властивостей, застосування. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології.* 2009. Т. 7, № 4. С. 1027–1059.

7. Чехун В. Ф. Создание новых лекарственных форм на основе нанокомпозитных материалов для решения современных проблем онкологии. Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології: зб. наук. праць. Т. 9, вип. 1. Київ, 2011. С. 261–274.

8. Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізико-хімічні та токсичні властивості. *Український журнал з проблем медицини праці.* 2013. № 4 (37). С. 62–74. https://doi.org/10.33573/ujoh2013.04.062.

9. Toxicology studies of a superparamagnetic iron oxide nanoparticle *in vivo*. S. Y. Liu et al. *Adv. Mater. Res.* 2008. V. 47–50. P. 1097–1100. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.47-50.1097.

10. Экспериментальные данные к оценке пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазона. Б. А. Канцельсон, Л. И. Привалова, С. В. Кузьмин и др. *Токсикологический вестник.* 2010. № 2. С. 17–24.

11. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. M. T. Zhu, W. Y. Feng, B. Wang et al. *Toxicology*. 2008. V. 247, Iss. 2–3. P. 102–111. https://doi.org/10.1016/j.tox.2008. 02.011.

12. Морфофункціональні зміни у внутрішніх органах щурів при тривалому введенні у черевну порожнину наночастинок оксиду заліза (Fe_2O_3). С. П. Луговський, Н. М. Дмитруха, М. М. Діденко, Л. В. Бакало, О. С. Лагутіна та ін. *Український журнал з проблем медицини праці.* 2019. V.15, № 3. С. 228–239. https://doi.org/10.33573/ujoh2019.03.228.

13. European convention for the protection of vertebrate animal used for experimental and other scientific purposes. Counsul of Europe. Strasburg, 1986. 53 p.

14. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва та ін.; за ред. І. П. Кайдашева. Полтава : Полімет, 2003. 320 с.

15. Антамонов М. Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. 2-е изд. Киев : 2017. 576 с.

16. Профілактична токсикологія та медична екологія. Вибрані лекції для науковців, лікарів та студентів: за заг. ред. акад. НАМНУ І. М. Трахтенберга. Київ : ВД «Авіцена», 2010. 248 с. ISBN 978-966-2144-27-7.

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

17. Мислицький В. Ф., Подолян С. К. Патологічні зміни тромбоцитарно-судинного та коагуляційного гемостазу під впливом хлористого свинцю та їх корекція за допомогою синтетичного аналога простацикліну. *Фізіологічний журнал.* 1999. № 4. С. 99–104.

18. Влияние наночастиц оксида железа (III) на свертываемость крови по данным светорассеяния. М. Н. Кириченко, Н. А. Булычев, Л. Л. Чайков и др. XIII International Conference on pulsed lasers and laser applications A M P L -2 0 1 7 September 10–15, 2017, Tomsk, Russia. https://doi.org/10.1117/ 12.2303510.

19. Endothelial dysfunction and inflamation induced by iron oxide nanoparticle exposur: Risk factors for early atherosclerosis. M. T. Zhu, B. Wang, Y. Wang et al. *Toxicol. Letter.* 2011. V. 203 (2). P. 162–171. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.021.

Трахтенберг И. М. , Дмитруха Н. Н., Короленко Т. К., Легкоступ Л. А., Лагутина О. С., Козлов К. П., Бакало Л. В.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА НА ОРГАНИЗМ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ИНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

Государственное учреждение «Институт медицины труда имени Ю. И. Кундиева Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев

Введение. Оксиды железа (Fe_2O_3, Fe_3O_4) в виде наночастиц (НЧ) являются перспективным материалом для промышленности, медицины и фармации. НЧ оксида железа могут попадать в организм человека с воздухом, едой и лекарствами. Наличие особых физико-химических свойств для НЧ (ультрамалый размер, большая площадь поверхности, повышенная реактивность и биологическая активность) требуют проведения фундаментальных исследований по оценке их безопасности. Важным вопросом является исследование поведения НЧ, а именно: их транспорт, распределение в органах, влияние на работу органов и систем при кратковременном и длительном поступлении в организм.

Цель исследования – экспериментальное исследование влияния коллоидных растворов оксида железа Fe_2O_3 различной дисперсности на организм крыс после однократного интратрахеального введения.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 24 крысах-самцах Wistar массой 220–260 г, распределенных на 2 опытные группы, которым однократно интратрахеально вводили коллоидные растворы Fe_2O_3 с частицами 19 нм и 400 нм в дозе по железу 10 мг/кг, контрольной группе животных тем же способом вводили 0,9 % физиологический раствор. На 21-е сутки эксперимента у крыс определяли массу тела, после эвтаназии под эфирным наркозом забирали кровь и органы, определяли гематологические показатели (общий анализ крови с подсчетом субпопуляций лейкоцитов, содержание цинкпротопорфирина), показатели коагулограммы, биохимические показатели, характеризующие состояние печени, почек, белкового и липидного обменов, неспецифического естественного иммунитета.

Результаты. Установлено, что однократное интратрахеальное введение крысам коллоидных растворов Fe_2O_3 не влияло на интегральные показатели – массу тела и органов. Введение раствора Fe_2O_3 с частицами 19 нм способствовало незначительному увеличению содержания железа в легких, тимусе и почках, а Fe_2O_3 с частицами 400 нм вызвало достоверное повышение концентрации железа в легких, печени, селезенке, тимусе и почках по сравнению с показателями в контрольной группе. Изменения гематологических показателей у крыс опытных групп характеризовались снижением уровня гемоглобина и количества эритроцитов, абсолютного количества лимфоцитов и гранулоцитов, увеличением уровня цинкпротопорфирина и процента моноцитов. Эти данные указывают на развитие анемии и активацию клеток неспецифического естественного иммунитета. Установленное увеличение количества тромбоцитов, фибриногена и протромбинового индекса, снижение тромбинового времени в опытных крыс свидетельствует о влиянии НЧ Fe_2O_3 на процесс свертывания крови. Установленные повышенные уровни С-реактивного белка и циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крыс опытных групп могут быть признаками формирования воспалительного процесса.

Выводы. Накопление железа в органах (сердце, печень, селезенка, почки) крыс опытных групп после однократного интратрахеального введения раствора Fe_2O_3 с частицами 400 нм свидетельствует об их повышенной аккумуляционной способности. Установленные нарушения клеточного и белкового состава крови указывают на потенциальное гематотоксическое, провоспалительное и атерогенное действие, особенно НЧ Fe_2O_3 19 нм.

Ключевые слова: коллоидные растворы оксида железа (Fe_2O_3), интратрахеальное введение, токсичность, безопасность

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

Trakhtenberg I. M., Dmytrukha N. M., Korolenko T. K., Lehkostup L. A., Lahutina O. S., Kozlov K. P., Bakalo L. V.

EXPERIMENTAL STUDY ON THE INFLUENCE OF IRON OXIDE NANOPARTICLES ON RATS AFTER A SINGLE INTRATRACHEAL ADMINISTRATION

State Institution «Kundiiev Institute of Occupational Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv

Introduction. Iron oxides (Fe_2O_3, Fe_3O_4) in the form of nanoparticles (NPs) is a promising material for industry, medicine and pharmacy. The iron oxide NPs can enter the human body with air, food and medicines. The availability of special physicochemical properties in NPs (small size, large surface area, increased reactivity and biological action) requires thorough research to assess their safety. Study the behaviour of iron oxides nanoparticles on entering the body, namely, their transport, distribution, and influence on the functioning of organs and systems, remains an important issue.

The aim of this research is experimental studies on the effect of Fe_2O_3 colloidal solutions of different dispersion on rats after a single intratracheal administration.

Materials and methods. The study was carried out on 24 Wistar male rats weighing 220–260 g, divided into two experimental groups. Rats were intratracheally injected once with colloidal solutions of Fe_2O_3 19 nm and 400 nm particles at a dose of 10 mg/kg for iron, the control group was injected with 0,9 % saline in the same way. On the 21st day of the experiment, the rats were sacrificed, and body and organ weighted, haematological parameters (complete blood count with counting leukocyte subpopulations, coagulogram), biochemical parameters characterizing the state of the liver, kidneys, protein and lipid metabolism, and nonspecific natural immunity were determined.

Results. It was found that a single intratracheal administration of colloidal solutions of Fe_2O_3 to rats did not affect the body and organ weight. 19 nm Fe_2O_3 led to a slight increase in the iron content in the lungs, thymus and kidneys, while 400 nm Fe_2O_3 caused a significant increase in iron concentration in the lungs, liver, spleen, thymus, and kidneys as compared to the control group. Changes in hematological parameters were characterized by a decrease in the level of hemoglobin and the number of erythrocytes, the absolute number of lymphocytes and granulocytes, an increase in the level of zinc protoporphyrin and the percentage of monocytes. The data indicate the development of anemia and activation of nonspecific immunity cells. The increase in the number of platelets, fibrinogen and prothrombin index, and decrease in thrombin time indicate the influence of Fe_2O_3 nanoparticles on the blood coagulation process. Elevated levels of C-reactive protein and circulating immune complexes in the serum can be signs of formation of an inflammatory process in the body.

Conclusions. The accumulation of iron in the heart, liver, spleen, kidneys after a single intratracheal injection of 400 nm Fe_2O_3 indicates their increased accumulation capacity. Disturbances in the cellular and protein composition of the blood indicate a potential hematotoxic, pro-inflammatory, and atherogenic effect, especially for Fe_2O_3 NPs of 19 nm.

Key words: colloidal solutions of iron oxide (Fe_2O_3), intratracheal administration, toxicity, safety

References

1. Narysy z toksykolohii vazshky metaliv. Vypusk V – Zalizo [Essays on the toxicology of heavy metals. Issue V – Iron], (2017), (ed. I. M. Trakhtenberg). Avicenna, Kyiv, Ukraine. ISBN 978-966-2144-96-3.

2. Albretsen Jay. (2006), «The toxicity of iron, an essential element», *Veterinary Medicine*, 2, 82–90.

3. Lubyanova I. P. (2013), Izbytochnoye zhelezo i patologiya u robochikh svarochnykh professiy [Excessive iron and pathology in workers of welding professions], Avicenna, Kyiv, Ukraine. ISBN 978-966-2144-59-8.

4. Patel R. R, Yi E. S., Ryu J. H. (2009), «Systemic iron overload associated with welder's siderosis», *The American Journal of the Medical Sciences*. 337 (1), 57–59. https://doi.org/10.1097/01.MAJ.0000308933.80112.49.

5. Ghio A. J. (2009), «Disruption of iron homeostasis and lung disease», *Biochim Biophys Acta*, 1790 (7), 731–739. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008. 11.004.

6. Dudchenko N. O. (2009), «Magnetic nanoparticles for medical and biological purposes: methods of synthesis, study of properties, application», *Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies*, 7 (4), 1027–1059.

7. Chekhun V. F. (2011), «Sozdanie novyh lekarstvennyh form na osnove nanocompozitnyh materialov dlay reshenia sovremennyh problem onkologii. *Nanosystemy, nanomaterialy, nanotehnologii*». Zb. nauk. prac. Kyiv : Vyp. 1, 261–274. Ukraine

8. Trakhtenberg I. M., Dmytrukha N. M. (2013), «Nanoparticles of metals, methods of definition, spheres of use, physicochemical and toxic properties», *Ukrainian Journal of Occupational Health*, 4 (37), 62–74. https://doi.org/10.33573/ujoh2013.04.062.

9. Liu S. Y. et al. (2008), «Toxicology studies of a superparamagnetic iron oxide nanoparticle *in vivo*», *Adv. Mater. Res.*, 47–50, 1097–1100. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.47-50.1097.

10. Katsnelson B. A., Privalova L. I., Kuzmin S. V. et al. (2010), «Experimental data on the assessment of

ISSN 2223-6775, Ukrainian Journal of Occupational Health, 2020, 16 (4), 251–260

pulmonotoxicity and resorptive toxicity of magnetite particles (Fe_3O_4) of the nano- and micrometer range», *Toksikologicheskiy vestnik*, 2, 17–24.

11. Zhu M. T., Feng W. Y., Wang B. et al. (2008), «Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats», *Toxicology*, 247 (2–3), 102–111. https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.02.011.

12. Lugovskyi S. P., Dmytrukha N. M., Didenko M. N., Bakalo L.V., Lahutina O. S. et al. (2019), «Morpho-functional changes in internal organs of rats in long-term administration of iron oxide nanoparticles into abnomical cavity», *Ukrainian Journal of Occupational Health,* 15 (3), 228–239. https://doi.org/10.33573/ujoh2019.03.228.

13. European convention for the protection of vertebrate animal used for experimental and other scientific purposes. (1986), Counsul of Europe, Strasburg.

14. Berkalo L. V., Bobovich O. V., Bobrova N. O. (2003), «Metody klinichnykh ta eksperymentalnykh doslidzhen v medytsyni» [Methods of clinical and experimental research in medicine], (ed. Kaideshev I.P.), Polimet, Poltava, Ukraine.

15. Antamonov M. U. (2017), Matematicheskaia obrabotka i analiz mediko-biologicheskih dannyh [Mathematical processing and analysis of medical and biological data]. 2-ed., Kiev, Ukraine.

16. Profilaktychna toksykologia ta medychna ekologia. Vybrani lekcii dlya naukovtsiv, likariv ta studentiv [Preventive toxicology and medical ecology. Selected lectures for scientists, doctors and students], 2012, (ed. I. M. Trakhtenberg), Avicenna, Kyiv, Ukraine. ISBN 978-966-2144-27-7.

17. Myslytsky V. F., Podolian S. K. (1999), «Pathological changes of platelet-vascular and coagulation hemostasis under the influence of lead chloride and their correction using a synthetic analogue of prostacyclin», *Physiological Journal*, 4, 99–104.

18. Kirichenko M. N., Bulychov N. A., Chaikov L. L. et al. (2017), «Influence of iron oxide nanoparticles (lll) on blood clotting according to light scattering data», XIII International Conference on pulsed lasers and laser applications A M P L, September 10–15, Tomsk, Russia. https://doi.org/10.1117/12.2303510.

19. Zhu M. T., Wang B., Wang Y. et al. (2011), «Endothelial dysfunction and inflamation induced by iron oxide nanoparticle exposur: Risk factors for early atherosclerosis», *Toxicol. Letter*, 203 (2), 162–171. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.021.

ORCID ID співавторів та їхній внесок у підготовку та написання статті:
Трахтенберг І. М. (0000-0003-1086-8279) – формулювання висновків;
Дмитруха Н. М. (ORCID ID 0000-0001-9161-3889) – аналіз отриманих результатів і даних літератури, підготовка матеріалу до друку;
Короленко Т. К. (ORCID ID 0000-0003-1390-4132) – участь у токсикологічному експерименті, проведення коагулометричних досліджень;
Легкоступ Л. А. (ORCID ID 0000-0002-8352-5616) – виконання токсикологічних досліджень, забір біоматеріалу, підготовка проб для хіміко-аналітичних досліджень, виконання біохімічних досліджень, статистична обробка отриманих результатів;
Лагутіна О. С. (ORCID ID 0000-0003-0723-1293) – забір біоматеріалу, виконання гематологічних досліджень, статистична обробка даних;
Козлов К. П. (ORCID ID 0000-0002-4048-9061) – виконання хіміко-аналітичних досліджень, статистична обробка отриманих результатів;
Бакало Л. В. (ORCID ID 0000-0003-3295-8937) – виконання біохімічних досліджень.

Інформація щодо джерел фінансування дослідження: дослідження виконано за темою «Дослідження механізмів кардіо-вазотоксичної дії наночастинок важких металів (до проблеми біобезпеки наноматеріалів), № держреєстрації 0119U100182.

Надійшла: 15 жовтня 2020 р.
Прийнята до друку: 2 листопада 2020 р.

Контактна особа: Дмитруха Наталія Миколаївна, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник, лабораторія промислової токсикології і гігієни праці при використанні хімічних речовин, ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва НАМНУ», буд. 75, вул. Саксаганського, м. Київ, 01033. Тел.: + 38 0 44 289 51 85.