

На правах рукописи

СОЛОВЬЕВА Светлана Николаевна

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ОЦЕНКИ ОПАСНОСТИ СУБМИКРОННЫХ
ЧАСТИЦ АМОРФНОГО ДИОКСИДА КРЕМНИЯ АТМОСФЕРНОГО
ВОЗДУХА ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ**

3.2.1 – Гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Екатеринбургский медицинский - научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

доктор медицинских наук

доктор медицинских наук, профессор

Сутункова Марина Петровна

Кузьмин Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Чашин Валерий Петрович - д.м.н., профессор Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Правительство Российской Федерации Институт экологии, главный научный сотрудник.

Скупневский Сергей Валерьевич - д.б.н., Институт биомедицинских исследований - филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», лаборатория субклеточных структур, заведующий отделом биомедицинских технологий, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «___» _____ 2021 г. на заседании диссертационного совета Д 64.1.008.01 при ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора по адресу: 141014, Московская область, городское поселение Мытищи, улица Семашко, дом 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора 141014, Московская область, городское поселение Мытищи, улица Семашко, дом 2, fncg@fferisman.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

ВРИО учёного секретарь
диссертационного совета Д 64.1.008.01,
доктор медицинских наук, профессор

Жеглова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

С наступлением эры нанотехнологий, искусственные наночастицы аморфного диоксида кремния оказались в числе пяти наиболее широко потребляемых наноматериалов (Vance M. E. et al., 2015), они применяются в химической промышленности (в качестве наполнителя полимеров, добавок к бетонам, гидрофобных покрытий, при создании термостойких материалов), в медицине, ветеринарии и других областях.

При многих металлургических процессах (сталеварение, производство ферросплавов и элементного кремния), а также при электродуговой сварке образуются и загрязняют окружающую атмосферу аэрозоли конденсации, содержащие в большем или меньшем проценте субмикронные, в том числе, наноразмерные частицы аморфного диоксида кремния, однако вклад в токсическое действие именно этой фракции не изучен.

В то же время, понимание гигиенической важности ингаляционного воздействия естественных аналогов этих наночастиц в составе аэрозольных эмиссий традиционных технологий, в значительной мере осталось в прошлом. Вероятно, именно поэтому отсутствует в литературе информация о новых хронических ингаляционных экспериментах с такими наночастицами в чистом виде или с содержащими их смешанными аэрозолями.

Кроме того, в СанПиН 1.2.3685-21 «Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест» установлена величина 0,02 мг/м³ для кремния диоксида аморфного, однако не оговорено процентное содержание аморфного SiO₂ в аэрозоле, хотя загрязнение атмосферного воздуха аэрозолем, состоящем только из этого вещества, нереально. К тому же ничего не сказано о размере частиц и поэтому неясно, в какой мере этот ОБУВ применим к рассматриваемому загрязнению воздуха частицами SiO₂ преимущественно субмикронного диапазона при

значительном проценте наночастиц и даже среднем диаметре, укладываемом в условную верхнюю границу нанометрового (т.е. <100 нм).

Указанная в этом же документе предельно допустимая концентрация (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест для неорганической пыли устанавливается по трем градациям процентного содержания двуоксида кремния в них. В частности, при содержании SiO₂ более 70% регламентированы максимальная разовая ПДК на уровне 0,15 мг/м³ и среднесуточная ПДК - 0,05 мг/м³. Однако применение этих нормативов к условиям загрязнения атмосферного воздуха населенных мест эмиссиями вышеназванных технологических процессов, как правило, используемое в надзорной практике, является далеко не самоочевидным, поскольку оно не обосновано ни с формальной, ни с научной точки зрения в связи с отсутствием указанием на то, о какой форме диоксида кремния (кристаллической или аморфной) идет речь.

Степень разработанности темы исследования

Из научной литературы хорошо известна высокая биологическая агрессивность именно нано-диоксида кремния. Однако многочисленные токсикологические эксперименты с нано-SiO₂ были проведены либо на клеточных культурах, либо в острых опытах на животных при парентеральном введении, либо при внутрижелудочном введении (например, Park and Park, 2009; Eom and Choi, 2009; Kim et al., 2010; Sergent et al., 2012; Du et al., 2013; Землянова М.А. и соавт., 2014; Зайцева Н.В. с соавт., 2016; Шумакова А.А. и соавт., 20141; 20142; 2015; Petric et al., 2016; Guo et al. 2015, 2016; Wang et al., 2017 и многие другие), и не опубликовано ни одного исследования, в котором токсичность и опасность этого вида искусственных наночастиц были бы оценены при хроническом ингаляционном воздействии.

Одним из наиболее эффективных методов анализа, используемых современной профилактической токсикологией, является математическое моделирование реакций организма на различные реальные воздействия. Такое

моделирование укрепляет теоретические основы оценки и управления рисками для здоровья человека и, таким образом, важно и для соответствующей практики.

Еще в начале 1990-х годов была построена структура многокамерной модели кинетики задержки практически нерастворимых частиц SiO_2 в легких (Katsnelson B.A., Privalova L.I, 1984; Привалова Л.И., 1990; Katsnelson B.A. et al., 1992, 1994, 1997), однако данная модель не учитывает ряд особенностей кинетики частиц нанометрового диапазона, например, растворение (Sutunkova M.P. et al, 2017).

Цель исследования - оценить воздействие на организм субмикронных частиц диоксида кремния (включая наноразмерную фракцию) промышленного аэрозоля кремния рудотермического производства ООО «РУСАЛ-ИТЦ» для обоснования методов управления риском здоровью.

В соответствии с целью исследования поставлены следующие задачи:

1. Изучить размерность, форму, химический состав и растворимость в биологических средах частиц реального промышленного кремнийсодержащего аэрозоля, отобранного из газохода рудотермической печи при выплавке элементного кремния.
2. Оценить опасность изучаемого промышленного аэрозоля и входящих в его состав субмикронных (в том числе, наноразмерных) частиц аморфного диоксида кремния при различных путях поступления.
3. Построить многокамерную модель прогнозирования задержки частиц изучаемого аэрозоля в легких и трахеобронхиальных лимфоузлах, учитывающую токсикокинетическую роль как физиологических механизмов элиминации и транслокации частиц, так и их растворения.
4. Обосновать критерии контроля технического кремния атмосферного воздуха эмиссиями рудотермического производства (ОБУВ).
5. Обосновать комплекс биопротекторов, тормозящих развитие цитотоксического действия наночастиц аморфного диоксида кремния.

Научная новизна исследования

Впервые:

- научно обоснован и разработан гигиенический норматив для контроля субмикронных частиц аморфного диоксида кремния, включая наноразмерную фракцию, в атмосферном воздухе населенных мест эмиссиями руднотермического производства ООО «РУСАЛ-ИТЦ» на основании экспериментальных исследований;
- установлена легочная фиброгенность, органо-системная токсичность и закономерность задержки в организме промышленного аэрозоля для оценки в качестве фактора риска для здоровья человека;
- прогнозирована задержка изучаемого аэрозоля в легких и трахеобронхиальных лимфоузлах при изучении физиологических механизмов элиминации, транслокации и растворения частиц аморфного диоксида кремния с использованием многокамерной модели;
- доказано, что цитотоксичность реального промышленного аэрозоля ниже цитотоксичности частиц синтетического аморфного кремния;
- установлена нормализация цитологических и биохимических показателей бронхоальвеолярного лаважа на фоне применения биопрофилактического комплекса;
- разработаны методические подходы к проведению экспериментальных работ при ингаляционном воздействии в системе «только нос» на мелких лабораторных животных.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая и практическая значимость исследования обоснована представленным к защите положением, общим подходам к установлению критериев контроля за содержанием в воздухе субмикронных частиц диоксида кремния (включая наноразмерную фракцию), на базе которых дана конкретная рекомендация соответствующего критерия для атмосферного воздуха, загрязняемого эмиссиями производства элементного кремния.

Методология и методы исследования. Методология исследования объединяет современные гигиенические, химические, лабораторные и

математические методы исследования. Используются современные методы оценки риска, математического моделирования и анализ результатов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наночастицы аморфного диоксида кремния, входящие в состав промышленного кремнийсодержащего аэрозоля являются основной причиной его высокой цитотоксичности.
2. Высокая растворимость наночастиц, входящих в состав изучаемого промышленного кремнийсодержащего аэрозоля обуславливает, незначительные силикотические изменения в легких и слабые проявления системной токсичности при хронической ингаляционной экспозиции.
3. Методы управления риском для здоровья, создаваемым вредным действием субмикронных (в том числе наноразмерных) частиц диоксида кремния на основе разработанного ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) кремнийсодержащей пыли газов рудотермических печей.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационное исследование выполнено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы: «Гигиеническое научное обоснование минимизации рисков здоровью населения России» на 2016-2020 гг.

Достоверность результатов диссертационной работы, научных положений, выводов и рекомендаций определены дизайном исследований, адекватным выбором методологии с использованием современных методов исследования, достаточным объемом полученной информации, соблюдением принципов доказательной медицины. Концептуальное построение работы базируется на глубоких общетеоретических знаниях и анализе практического опыта.

Результаты работы доложены и обсуждены на 9 конференциях различного уровня, в том числе лично на 5-ти: устный доклад на 4ой Международной конференции профессионального здоровья и безопасности. 28-29 мая 2018 г., Лондон, Великобритания; устный доклад на Всемирном саммите по токсикологии и оценке риска. 24-25 октября 2018г., Париж, Франция; устный доклад на Евросаммите 2019, 13-15 мая 2019г., Рим, Италия; постерный доклад

на международной конференции Scanning Probe Microscopy, Russia-China Workshop on Dielectric and Ferroelectric Materials с 25 по 28 августа 2019 г. в г. Екатеринбург; постерный доклад на конференцию III International School-Conference «Applied Nanotechnology and Nanotoxicology» с 10 по 13 октября 2019 г. в г. Сочи.

Работа заслушана и апробирована на расширенном заседании ученого совета ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (Протокол № 7 от 22.12.2020 г.) и межотдельческой конференции ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» (Заключение от 28.06.2021 г.)

Внедрение результатов внедрения

Материалы диссертации использованы при подготовке:

- методических указаний МУ 1.2.3699-21 «Подходы к экспериментально - токсикологическому обоснованию предельно допустимых концентраций наночастиц в воздухе рабочей зоны», утвержденных руководителем Роспотребнадзора РФ А.Ю. Поповой от 30 августа 2021 г.;
- методических рекомендаций МР 1.2.0151-19 «Подходы к проведению ингаляционных экспериментов с наноразмерными аэрозолями на мелких лабораторных животных», утвержденных руководителем Роспотребнадзора РФ А.Ю. Поповой 15 августа 2019 г.;
- при оформлении результатов интеллектуальной деятельности: «Способ повышения устойчивости организма к вредному действию наночастиц аморфного диоксида кремния» (Патент № 2 738 565);
- в практической деятельности учреждений Роспотребнадзора Свердловской области в системе социально-гигиенического мониторинга от 5 апреля 2021 г.;
- учебно-методических программ по дисциплинам «Коммунальная гигиена» и «Экологические аспекты коммунальной гигиены» для студентов медико-профилактического факультета «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России от 07.09.2021 г.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно осуществлен информативный обзор литературных данных по теме диссертации, поставлены

цели и задачи исследования. Автор непосредственно участвовал в планировании, организации, проведении экспериментальной части работы. Лично проведен сбор первичных данных и статистическая обработка полученных результатов. Сформулированы выводы и практические рекомендации. Доля личного участия автора по всем разделам работы составила не менее 85%.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 6 – в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и 4 публикации в зарубежных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 46 отечественных и 47 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлена актуальность и степень разработанности темы диссертационного исследования, поставлена цель и задачи работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость, степень достоверности и результаты апробации работы, практический выход, личный вклад автора, структура и объем диссертации.

В первой главе описан процесс рудотермического процесса, проводимого в электродуговой печи с открытым колошником и образование аэрозоля конденсации содержащей пыль кремния.

Информационный поиск продемонстрировал актуальность изучения первичных механизмов действия наноразмерных веществ на клетку. Описаны литературные источники по различным методам воздействия наночастиц аморфного диоксида кремния на организм в том числе *in vitro*.

Проведен теоретический поиск способов повышения устойчивости организма к вредным воздействиям. Определен состав биопрофилактического комплекса.

Во второй главе представлена общая характеристика дизайна экспериментов, проведенных на белых аутбредных крысах:

- при ингаляционном пути поступления в установке «только нос» фирмы SH Technologies (USA) обеспечивающая поступление вещества в организм только через органы дыхания. со средними концентрациями $2,6 \pm 0,6 \text{ мг/м}^3$ и $10,6 \pm 2,1 \text{ мг/м}^3$. При обоих режимах ингаляционный период (по 4 часа в день, 5 раз в неделю) продолжался до 6 месяцев с промежуточным сроком умерщвления части животных в 3 месяца. В качестве основного испытываемого материала использовался порошок (ПА SiO_2), собранный в горизонтальном участке газохода от зонта над руднотермической печью в производстве элементного («металлического») кремния на ООО «Русал-Кремний», и просеянный через сито $< 2 \text{ мкм.}$;

- при внутрибрюшинном введении использована водная суспензия (НЧ SiO_2) приготовленная в Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина» методом лазерной абляции. Сферическая форма и размерность частиц были охарактеризованы с использованием сканирующей электронной микроскопии, химическая идентичность Суспензия вводилась 3 раза в неделю в течение 6 недель в концентрации 0,5 мг/мл.

- реакция альвеолярного фагоцитоза оценивалась путем проведения бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) через 24 часа после однократного интратрахеального введения частиц ПА SiO_2 ; НЧ SiO_2 ; коммерческого промышленного образца 100 % аморфного диоксида кремния (АК SiO_2) и образца сравнения стандартного кварца (DQ_{12}) в объеме 1 мл водной суспензии.

Токсикологические эксперименты были проведены на половозрелых аутбредных белых крысах-самках собственного разведения с исходной массой тела около 200 гр. (начальный возраст 3-4 мес.) при трех различных путях

введения. Все экспериментальные животные делились на группы не менее 10 крыс в каждой. Каждому животному была присвоена групповая и индивидуальная метка, характеризующая принадлежность к группе и индивидуальный номер в эксперименте (таблица 1).

Таблица 1 – Серии экспериментов

№ п/п	Серии экспериментов	Число крыс	Количество исследований
Оценка реакции альвеолярного фагоцитоза			
<i>при интратрахеальном введении:</i>			
1	ПА SiO ₂ 90нм; НЧ SiO ₂ 43нм; DQ ₁₂	40	320
2	ПА SiO ₂ 90нм; АК SiO ₂ 40 нм	30	240
3	НЧ SiO ₂ 43нм; НЧ SiO ₂ 43нм +БПК	40	320
<i>при внутрибрюшинном введении:</i>			
4	НЧ SiO ₂ 43нм итого 18 введений	24	1704
<i>при ингаляционной экспозиции:</i>			
5	ПА SiO ₂ в течение 3 и 6 месяцев	120	5880

Условия содержания по микроклимату и освещенности помещения, содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Международных руководящих принципов биомедицинских исследований с участием животных (Council for International Organizations of Medical Sciences and International Council for Laboratory Animal Science) и ГОСТ 33215-2014 «Межгосударственный стандарт руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Методы исследования одобрены Локальным независимым этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (№6, №7 - 2016г; №9 - 2018г.).

Токсические эффекты воздействия в хроническом ингаляционном и субхроническом внутрибрюшинном экспериментах оценивались по большому числу информативных показателей: масса тела (исходная и конечная), масса внутренних органов, серия поведенческих тестов. Осуществлялся 24-часовой сбор мочи для определения ее объема, удельного веса и содержания копропорфирина, дельта-аминолевулиновой кислоты (Н.А. Павловская, 1998),

общего белка, креатинина, мочевины и мочевой кислоты (В.В. Меньшиков, 1986).

Крыс умерщвляли перерезанием шейных сосудов и производили сбор крови на необходимые анализы, а также вскрытие полостей для извлечения, взвешивания и исследования внутренних органов.

На автоматическом гематологическом анализаторе МУТНІС-18 определялись показатели: гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцитов, тромбоцита, а также числа эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. В качестве показателя общей интенсивности окислительно-восстановительного энергетического метаболизма – определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови, основанное на восстановлении *para*-нитротетразолия фиолетового до формазана и подсчете гранул в 50 клетках последнего при оптической микроскопии с иммерсией (Нарциссов Р.П., 1969). В сыворотке крови – содержание общего белка и соотношение белковых фракций (альбуминов и глобулинов), активность аланинаминотрансферазы (АлТ), аспаргатаминотрансферазы (АсТ), гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы и содержание билирубина при помощи биохимического анализатора «Кобас Интегра» с использованием соответствующих диагностических наборов. Определение SH-группы в плазме крови (Ellman G., 1979), активность каталазы (Меньшиков В.В. с соавт., 1987), малонового диальдегида (Андреева Л.И., 1988) и церулоплазмينا (Бестужева С.В., 1976).

Количественное содержание вводимого в организм вещества в органах и в выделениях определяли с помощью атомной эмиссионной спектроскопии. Количественная оценка интенсивности силикозного процесса в легких произведена с помощью показателей: сухая масса легких; общее содержание в легких оксипролина (Еловская Л.Т., 1983); содержание суммарных липидов (Хвапил М., 1960). Описательная оценка гистопатологических проявлений токсического повреждения внутренних органов (Гонохова М.Н., 2013; Кругликов Г.Г., 2014; Досынбаева Г.Н., 2016); оценка мутагенного эффекта ПА

SiO₂ в костном мозге крыс по количеству микроядер в полихроматофильных эритроцитах (Методические рекомендации. № 8-6/10, 1984, OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 474, 2016), тестирование по нарушению структуры и репарации ДНК (с помощью ПДАФ-теста) по коэффициенту фрагментации (Кфр) геномной ДНК в костном мозге и в ядерных клетках крови (Wang S., 2017; Sharifiyazdi H., 2018; Ningombam S.S., 2018).

Для выявления ультраструктурных повреждений клеток легких и обонятельных нервных волокон в передней области мозга применена просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с использованием ультрамикротомы (PowerTome, «RMC», США) и микроскопа AURIGA («CarlZeiss; MT», Германия) в STEM режиме в диапазоне увеличения от x1200 до x200000.

Различия между среднегрупповыми количественными результатами обрабатывались с помощью критериев Стьюдента с использованием компьютерной программы Excel. Различие между средними величинами считалось статистически значимым, если вероятность возникновения случайного различия не превышала 5 % ($p \leq 0,05$). Данные по оценке мутагенного эффекта дополнительно были проверены по точному критерию Фишера.

Третья глава посвящена хроническому ингаляционному эксперименту. Используемый промышленный аэрозоль состоит преимущественно из аморфного диоксида кремния. Сканирующая электронная микроскопия этого материала выявила численное преобладание частиц правильной сферической формы и размером менее 100 нм (рисунок 1а). Они же преобладают в СЭМ-образе поликарбонатного фильтра, через который протягивался воздух из автоматически управляемой многоярусной ингаляционной установки типа «только нос» в точках, соответствующих зоне дыхания крыс. Отмечено преобладание сферических частиц нанометрового диапазона (при среднем диаметре 90 нм) (рисунок 1б), что косвенно подтверждает идентификацию этих НЧ как частиц аэрозоля конденсации SiO₂ (рисунок 1в).

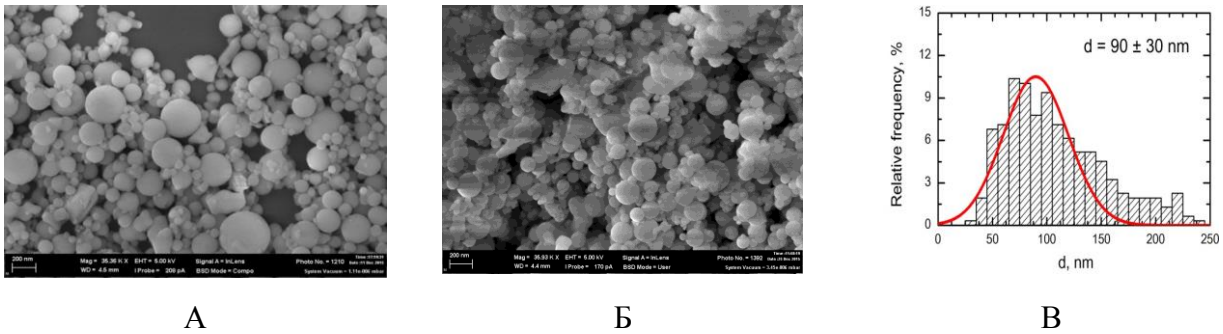


Рисунок 1– (а) Частицы порошка, отобранного из газохода от зонта над руднотермической печью плавки кремния и просеянного через сито < 2 мкм. Сканирующая электронная микроскопия, увеличение $\times 35\,930$; (б) Проба витающих частиц, отобранных на фильтр из ингаляционной установки при загрузке пылеподатчика этим порошком. Сканирующая электронная микроскопия, увеличение $\times 35\,930$; (в) Распределение по диаметрам и средний диаметр сферических частиц, измеренных на СЭМ-фотографии фильтра, через который протягивался воздух из зоны дыхания крыс в ингаляционной установке «только нос»

Однако в обоих случаях заметны отдельные относительно крупные частицы неправильной формы, свойственные аэрозолям дезинтеграции и связанные, вероятнее всего, с выносом газовым потоком шихтовых материалов (кварцита и кокса) из поверхностных слоев колошника. Такая трактовка подтверждается химическим составом смешанного аэрозоля, в котором обнаружено 78 % свободного SiO_2 , в том числе 72 % – аморфного и только 6 % – кристаллического.

В таблице 2 представлены результаты хронического ингаляционного эксперимента с исследуемым порошком ПА SiO_2 в которой показатель «относительная масса сырых легких» ниже контрольного значения. Относительная масса сухой легочной ткани не увеличена. Такой чувствительный показатель развития силикотического процесса как «абсолютное содержание липидов в легких» ниже контрольного значения, а наиболее характерное для силикоза усиленное коллагенообразование, отражающееся увеличением содержания суммарного оксипролина, было повышено статистически не значимо только в концентрации $10,6$ мг/м³.

Таблица 2 – Некоторые показатели состояния легких у крыс, подвергшихся 6-месячному ингаляционному воздействию ПА SiO₂ (X±S_x)

Показатели	Контроль	ПА SiO ₂ 2,6 мг/м ³	ПА SiO ₂ 10,6 мг/м ³
Относительная масса сырых легких, г. на 100 г массы тела	1,05±0,15	0,89±0,07	0,97±0,10
Относительная масса сухих легких, г. на 100 г массы тела	0,17±0,02	0,17±0,02	0,16±0,01
Абсолютное содержание липидов в легких, мг	68,02±5,63	36,98±4,81*	60,64±4,56
Абсолютное содержание оксипролина в легких, мкг	4112,15±578,34	3048,12±532,91•	6141,72±945,94
Содержание оксипролина в легких, мкг на 100 г массы тела	1652,98±208,81	1145,94±209,42•	2227,05±342,47

Значком * отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие от контрольной группы; • отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие между двумя подопытными группами (по t-критерию Стьюдента при p≤0,05)

Слабовыраженное развитие силикоза может быть объяснено низкой задержкой SiO₂ в легких из-за доказанной относительно высокой растворимости данных наночастиц в биологической среде (рисунок 2).



Рисунок 2 – Сравнительная кинетика растворения ПА SiO₂ *in vitro* в физиологическом растворе и в БАЛЖ

Ключевая роль этого растворения как механизма ускоренной элиминации (соответственно, низкой легочной задержки) ПА SiO₂ подтверждена при анализе математической многокамерной модели этого процесса (рисунки 3 и 4).

Вместе с тем, свидетельством выведения из дыхательных путей в ЖКТ нерастворившихся частиц является повышенное содержание SiO₂ в кале (рисунок 5).

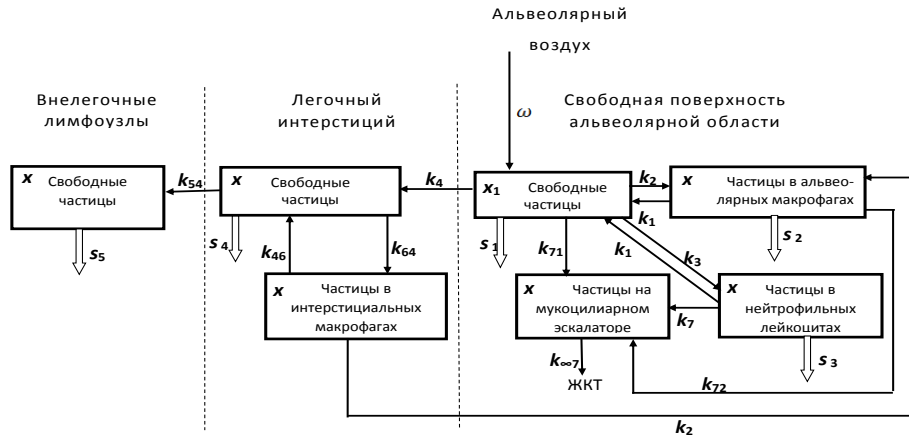


Рисунок 3 – Структура модели с элиминационными потоками, связанными с растворением частиц. Вариант моделирования, найденный адекватным для аппроксимации задержки наночастиц SiO₂

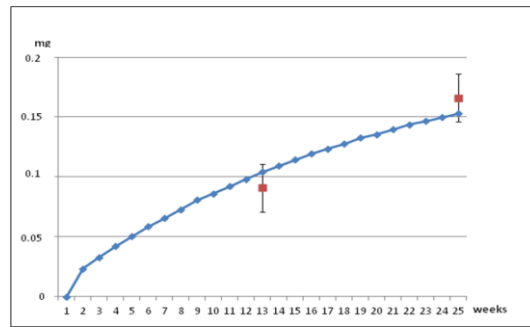


Рисунок 4 – Накопление SiO₂ в легких крысы в результате хронической ингаляции ПА SiO₂ в концентрации 2,6 мг/м³ по средним фактическим данным (красные прямоугольники) в сроки 3 и 6 мес. и по прогнозу (синяя кривая) математической модели, учитывающей как физиологические механизмы элиминации частиц, так и их растворение

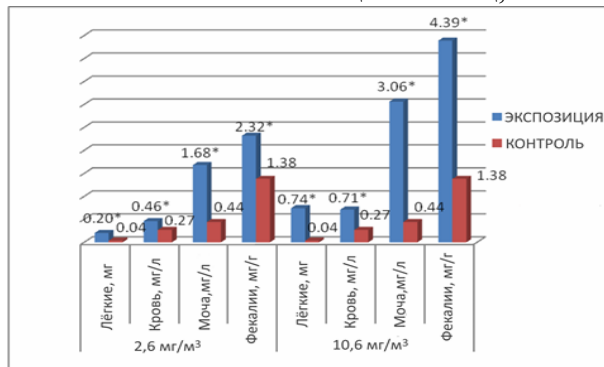


Рисунок 5 – Содержание SiO₂ в легких, крови, моче и кале крыс после 6-месячного ингаляционного воздействия ПА SiO₂ при двух испытанных концентрациях (значком * отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие от контрольной группы)

Кроме того, при электронной микроскопии ольфакторной области мозга в теле отдельных нейронов обнаруживается значительное количество наночастиц

ПА SiO₂, проникающих трансназально при ингаляционном воздействии на крыс (рисунок 6).

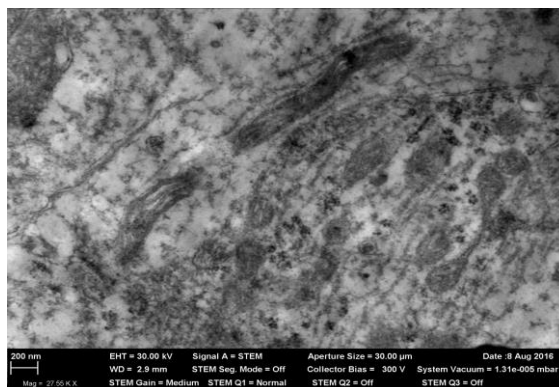


Рисунок 6 – Наночастицы в теле нейрона при ингаляционном воздействии ПА SiO₂ в концентрации 2,6 мг/м³ в течение 3 месяцев, увеличение *27550

При этом никаких признаков нарушения ультраструктуры нагруженного наночастицами нейрона обнаружено не было. Так же не обнаружены нарушения в поведенческих реакциях крыс (СПП, число заглядываний в норки и количество пересеченных квадратов за 3 минуты). Полагается, что потенциальный риск такого действия может не приниматься во внимание как ключевой критерий вредности при итоговой экспертной оценке токсичности и опасности изученного аэрозоля.

Под влиянием частиц ПА SiO₂ число клеток с микроядрами у крыс статистически значимо не увеличилось по сравнению с контролем во всех изученных концентрациях и сроках экспериментах. Частицы ПА SiO₂ в изученных концентрациях не обладают мутагенным действием и не вызывают цитогенетических изменений. Минимально наблюдавшаяся величина *p* была равна 0,28 (MP 8-6/10, 1984; OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 474, 2016).

Однако при проведении тестирования по нарушению структуры и репарации ДНК в клетках крови и костного мозга у крыс с использованием ПДАФ-теста было отмечено усиление фрагментации ДНК на фоне низкой системной токсичности при ингаляционном воздействии частицы ПА SiO₂, и даже при концентрации 2,6 мг/м³ (Таблица 3).

Таблица 3 – Коэффициент фрагментации геномной ДНК (ПДАФ-тест) в клетках крови и костного мозга у крыс, подвергшихся 6 месячной ингаляционной экспозиции к частицам ПА SiO₂ (X±S_x)

Коэффициент фрагментации ДНК	Контроль	Концентрация в камере	
		2,6 мг/м ³	10,6 мг/м ³
ядросодержащих клетках крови	0,4240±0,0005	0,4622±0,0004*	0,4704±0,0005*•
миелокариocyтах костного мозга	0,3995±0,0005	0,4043±0,0003*	0,4316±0,0003*•

Значком * отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие от контрольной группы; • отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие между двумя опытными группами (по t-критерию Стьюдента при p≤0,05)

Повышение содержания SiO₂ в циркулирующей крови и во внутренних органах, также связанное с вышеуказанной резорбцией, не достигло тех уровней, при которых могли бы проявиться явные эффекты системной токсичности. Обнаружено дозо-зависимое повышение фрагментации геномной ДНК тех же экспозиций, что (наряду с трансназальным проникновением наночастиц в головной мозг) диктует осторожность при итоговой оценке опасности изученного ПА SiO₂ как фактора профессионального и экологически обусловленного рисков для здоровья.

Четвертая глава. Известным ключевым механизмом самоочищения пульмонарной области дыхательных путей является мобилизация на ее свободную поверхность клеток, способных фагоцитировать мельчайшие частицы, тем самым препятствуя их пенетрации в легочный интерстициум и способствуя выведению по пути мукоцилиарного транспорта. Основным эффектором фагоцитарного звена пульмонарного клиренса являются легочные альвеолярные макрофаги, а вспомогательным – нейтрофильные лейкоциты. Исследованиями Л.И. Приваловой и Б.А. Кацнельсона было доказано, что мобилизация нейтрофилов играет важную компенсаторную роль, а сама контролируется количеством продуктов макрофагального разрушения и поэтому тем интенсивнее, чем выше повреждающее действие (цитотоксичность) частиц для макрофага. В связи с этим отношение нейтрофилов к макрофагам (НЛ/АМ) в клеточной популяции бронхо-альвеолярного лаважа служит косвенным, но

достаточно надежным показателем сравнительной цитотоксичности различных частиц.

Для проверки гипотезы, что из всех компонентов ПА SiO₂ основной причиной его высокой цитотоксичности, являются преобладающие в составе наночастицы аморфного диоксида кремния был проведен эксперимент при интратрахеальном введении малых доз частиц 0,5 мг ПА SiO₂ со средним диаметром 90±30 нм в сравнении со специально созданными НЧ SiO₂ (43±22 нм) и стандартной кварцевой пылью DQ₁₂ (Таблица 4).

Таблица 4 – Число клеток в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии частиц (X±Sx)

Введенное вещество	Число клеток ^{АБ}			НЛ/АМ
	Общее	Альвеолярные макрофаги (АМ)	Нейтрофильные лейкоциты (НЛ)	
суспензии частиц в дозе 0,5 мг в 1мл суспензии				
Контроль	2,27 ± 0,44	1,20 ± 0,29	1,06 ± 0,33	1,25 ± 0,40
ПА SiO ₂	3,71 ± 0,73	1,71 ± 0,33	1,95 ± 0,55	1,36 ± 0,38
DQ ₁₂	3,60 ± 0,69	1,14 ± 0,13	2,45 ± 0,66	2,01 ± 0,55
НЧ SiO ₂	4,11 ± 0,89	1,27 ± 0,25	2,79 ± 0,73*	2,50 ± 0,44*
суспензии частиц в дозе 7 мг в 1мл суспензии				
Контроль	2,04 ± 0,30	0,20 ± 0,03	1,85 ± 0,29	0,11 ± 0,02
АК SiO ₂	11,97 ± 3,84*	7,18 ± 2,84*	4,78 ± 1,53	1,42 ± 0,45*
ПА SiO ₂	3,71 ± 0,86•	1,24 ± 0,45*•	2,64 ± 0,53	0,39 ± 0,09*•

Значком * отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие от контрольной группы; • отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие между двумя подопытными группами (по t-критерию Стьюдента $p \leq 0,05$)

Судя по показателю НЛ/АМ наибольшей цитотоксичностью обладают искусственно созданные НЧ SiO₂. Введение стандартной кварцевой пыли DQ₁₂ и ПА SiO₂ вызывает увеличение притока общей клеточности в основном за счет мобилизации нейтрофильных лейкоцитов, однако эти изменения статистически не значимы. В сравнении с коммерческим промышленным образцом 100% аморфного диоксида кремния АК SiO₂ со средним диаметром 5-60 нм и дозе 7 мг в 1 мл частицы ПА SiO₂ проявили себя еще менее агрессивными. Цитотоксичность частиц ПА SiO₂ была в 3,6 раза ниже, в сравнении с частицами АК SiO₂ оцененная по отношению НЛ/АМ, которое в контрольной группе было равно 0,11 ± 0,02.

Таким образом, цитотоксичность ПА SiO_2 может быть объяснена преимущественным содержанием в нем наночастиц аморфного диоксида кремния.

Поэтому образец аморфного диоксида кремния НЧ SiO_2 был использован в субхроническом эксперименте при внутрибрюшинном введении как модельный для дополнительного изучения токсических свойств ПА SiO_2 , учитывая, что тот же компонент составляет большую или меньшую, но всегда существенную часть и в ряде других промышленных аэрозолей конденсации.

Из более 60 физиологических, цитологических и биохимических показателей состояния организма контрольной и подопытной групп, только 9 статистически значимо отличались от соответствующих контрольных. Наблюдались признаки гемолитической анемии (снижение уровня гемоглобина и числа эритроцитов при повышенной пропорции ретикулоцитов) и повреждения печени (ослабление белково-образовательной и ферментобразовательной функции). Было отмечено статистически значимое увеличение коэффициента фрагментации геномной ДНК в ПДАФ тесте в клетках крови в опытной группе $0,4288 \pm 0,0061$ и $0,4023 \pm 0,0064$ в контрольной. В целом довольно низкая субхроническая токсичность изучаемого вещества на системно-организменном уровне соответствует столь же низкой хронической ингаляционной токсичности ПА SiO_2 . Таким образом, рассматриваемые результаты не противоречат высказанному выше предположению, что наночастицы аморфного диоксида кремния являются той фракцией ПА SiO_2 , которая определяет его вредное действие на организм.

Сопоставление результатов БАЛЖ на разовое интратрахеальное введение суспензии ПА SiO_2 со сдвигами в состоянии организма при его хроническом ингаляционном воздействии, подтверждают, что именно наночастицы аморфного диоксида кремния являются компонентом, не только преобладающим по массе в составе промышленного аэрозоля, но и определяющим его токсичность.

Показана эффективность перорального назначения биопрфилактического комплекса, против вредного цитотоксического действия наночастиц аморфного диоксида кремния, оцененного по цитологическим показателям бронхоальвеолярного лаважа.

Таблица 5 – Число клеток в жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже (БАЛЖ) через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии НЧ SiO₂, в дозе 0,5 мг в 1мл физ. раствора, и/или биопрфилактического комплекса ($X \pm S_x$)

Группа крыс, получавшая:	Число клеток* 10 ⁶			НЛ/АМ
	Общее	альвеолярные макрофаги (АМ)	нейтрофильные лейкоциты (НЛ)	
Контроль	2,27 ± 0,44	1,20 ± 0,29	1,06 ± 0,33	1,25 ± 0,40
НЧ SiO ₂	4,11 ± 0,89	1,27 ± 0,25	2,79 ± 0,73*	2,50 ± 0,44*
НЧ SiO ₂ +БПК	2,64 ± 0,64	1,28 ± 0,14	1,35 ± 0,63	1,34 ± 0,54
Контроль+БПК	2,10 ± 0,29	1,31 ± 0,18	0,79 ± 0,27	0,76 ± 0,30

Значком * отмечены значения, имеющие статистически достоверное отличие от контрольной

У группы животных, получавших предварительно курс биопрфилактического комплекса до интратрахеального введения суспензии НЧ SiO₂, все эти показатели нормализовались, то есть не имели статистически значимых отличий от соответствующих контрольных величин. Все цитологические показатели у крыс дополнительной контрольной группы (БПК) не отличались от контрольных значений, что свидетельствует о безвредности самого биопрфилактического комплекса.

В заключении обобщены полученные результаты экспериментальных исследований и даны рекомендации применения для контроля загрязнения атмосферного воздуха населенных мест эмиссиями руднотермического производства технического кремния величину ориентир безопасного уровня воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест с 50-кратным коэффициентом запаса от возможной пороговой (2,6 мг/м³), то есть 0,052 с округлением до 0,05 мг/м³.

ВЫВОДЫ

1. Основную часть промышленного аэрозоля, отобранного из газохода руднотермической печи при выплавке элементного кремния, составляют сферические частицы диоксида кремния диаметром 90 ± 30 нм. Растворимость кремнийсодержащего промышленного аэрозоля в биологических средах организма в 2,2 раза выше, чем в физиологическом растворе.
2. Цитотоксическое действие, промышленного кремнийсодержащего аэрозоля, имеющего в своем составе 72 % аморфного диоксида кремния, и определяемое отношением числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов, выявлено в 3,6 раза ниже, чем при воздействии 100 % аморфного диоксида кремния.
3. Низкая резорбтивная токсичность промышленного аэрозоля на системно-организменном уровне соответствует столь же низкой фиброгенности, концентрация $2,6 \text{ мг/м}^3$ может быть принята как пороговая.
4. Увеличение коэффициента фрагментации ДНК при ингаляционном пути введения кремнийсодержащего промышленного аэрозоля статистически значимо в ядросодержащих клетках крови (контроль – $0,4240\pm 0,0005$; в опытной группе при концентрации $2,6 \text{ мг/м}^3$ – $0,4622\pm 0,0004$; при концентрации $10,6 \text{ мг/м}^3$ – $0,4704\pm 0,0005$) и в миелокариоцитах костного мозга (контроль – $0,3995\pm 0,0005$; в опытной группе при концентрации $2,6 \text{ мг/м}^3$ – $0,4043\pm 0,0003$; при концентрации $10,6 \text{ мг/м}^3$ – $0,4316\pm 0,0003$).
5. Предложена методика для разработки гигиенических нормативов ксенобиотиков в атмосферном воздухе населенных мест с использованием ингаляционной системы «только нос».
6. По результатам токсиколого-гигиенических исследований обоснован критерий контроля загрязнения атмосферного воздуха эмиссиями производства элементного кремния ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест составляющий $0,05 \text{ мг/м}^3$ с коэффициентом запаса 50 от возможной пороговой концентрации ($2,6 \text{ мг/м}^3$).

7. Применение биопрофилактического комплекса на лабораторных животных, приводит к нормализации как цитологических, так и биохимических показателей бронхоальвеолярного лаважа и повышению резистентности организма к цитотоксическому действию специально синтезированного 100% аморфного диоксида кремния.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследований позволили обосновать следующие рекомендации.

Для специалистов санитарно-эпидемиологической службы и научно-исследовательских организаций материалы целесообразно использовать в практической деятельности при ведении социально-гигиенического мониторинга. При постановке токсиколого-гигиенического эксперимента учитывать способность изучаемого аэрозоля содержащего аморфный диоксид кремния к увеличению фрагментации ДНК и возможности накопления частиц в головном мозге.

Учреждениям высшего профессионального образования для внедрения в учебный процесс кафедры гигиены: материалы необходимо использовать в лекционном курсе и на практических занятиях по дисциплинам «Коммунальная гигиена» и «Экологические аспекты коммунальной гигиены» для студентов медико-профилактического факультета.

Перспективы дальнейшего развития. Изучение механизмов ингаляционной токсичности наночастиц с токсикокинетикой и токсикодинамикой на молекулярном уровне.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Некоторые особенности реакции организма на хроническую ингаляцию SiO₂-содержащих субмикронных (преимущественно наноразмерных) частиц реального промышленного аэрозоля / М.П. Сутункова, **С.Н. Соловьева**, Б.А. Кацнельсон, В.Б. Гурвич, Л.И. Привалова, И.А. Минигалиева, Т.В. Слышкина, И.Е. Валамина, В.Я. Шур, И.В. Зубарев, Д.К. Кузнецов // **Токсикологический вестник**. – 2017. – № 3 (144). – С. 17-26.
 2. **Соловьева С.Н.** О критериях гигиенической оценки атмосферных концентраций промышленных аэрозолей с высоким содержанием наночастиц аморфного диоксида кремния / С.Н. Соловьева, М.П. Сутункова, Б.А. Кацнельсон // **Гигиена и санитария**. – 2017. – Т. 96, № 12. – С. 1179-1181.
 3. Сравнительная и комбинированная токсичность наночастиц оксидов алюминия, титана и кремния и ее ослабление комплексом биопротекторов / И.А. Минигалиева, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова, В.Б. Гурвич, В.Я. Шур, Е.В. Шишкина, И.Е. Валамина, О.Г. Макеев, В.Г. Панов, А.Н. Вараксин, С.В. Клинова, **С.Н. Соловьева**, Е.Ю. Мещерякова // **Токсикологический вестник**. – 2018. – № 2 (149). – С. 18-27.
 4. Многокамерная модель как инструмент анализа токсикокинетической роли растворения элементо-оксидных наночастиц и фагоцитарной реакции на их отложение в легких при хронической ингаляционной экспозиции / Б.А. Кацнельсон, М.П. Сутункова, Л.К. Коньшева, **С.Н. Соловьева**, И.А. Минигалиева, В.Б. Гурвич, Л.И. Привалова // **Токсикологический вестник**. – 2019. – № 5 (158). – С. 12-20.
 5. Повышение устойчивости организма к вредному цитотоксическому действию наночастиц аморфного диоксида кремния / **С.Н. Соловьева**, М.П. Сутункова, И.А. Минигалиева, И.Н. Чернышов, В.Б. Гурвич, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова // **Здоровье населения и среда обитания**. – 2020. – № 11 (332). – С. 62-66.
 6. Оценка цитотоксичности реального промышленного аэрозоля, содержащего высокий процент аморфного диоксида кремния в нанометровом диапазоне. **С.Н. Соловьева**, М.П. Сутункова, С.В. Кузьмин, Л.И. Привалова, В.Б. Гурвич, Б.А. Кацнельсон // **Гигиена и санитария**. – 2021. – № 100 (9). – С. 938-942.
- Публикации в других научных изданиях*
7. Consequent stages of developing a multi – compartmental mechanistic model for chronically inhaled nanoparticles pulmonary retention / В.А. Katsnelson, М.Р. Sutunkova, L.K. Konysheva, **S.N. Solovyeva**, Minigalieva I.A. Gurvich V.B., Privalova L.I. // **Toxicology Reports**. – 2019. – Vol. 6 – P. 279-287.
 8. A paradoxical response of the rat organism to long-term inhalation of silica-containing submicron (predominantly nanoscale) particles of a collected industrial aerosol at realistic exposure levels / М.Р. Sutunkova, **S.N. Solovyeva**, В.А. Katsnelson, V.B. Gurvich, L.I. Privalova, I.A. Minigalieva, T.V. Slyshkina, I.E. Valamina, O.H. Makeyev, V.Y. Shur, I.V. Zubarev, D.K. Kuznetsov, E.V. Shishkina // **Toxicology**. – 2017. – Vol. 384. – P. 59-68. – DOI: 10.1016/j.tox.2017.04.010.
 9. Organism's responses to a long-term inhalation of silica-containing submicron particles of an industrial aerosol / М. Sutunkova, **S. Solovyeva**, В. Katsnelson, V. Gurvich, L. Privalova, I. Minigalieva, L. Konysheva, T. Slyshkina, I. Valamina, V. Shur, I. Zubarev, D. Kuznetsov // **Toxicology Letters**. – 2017. – Vol. 280, Suppl. 1. – P. S316.
 10. Combined Subchronic Toxicity of Aluminum (III), Titanium (IV) and Silicon (IV) Oxide Nanoparticles and its Alleviation with a Complex of Bioprotectors / I.A. Minigalieva, В.А. Katsnelson, L.I. Privalova, М.Р. Sutunkova, V.B. Gurvich, T.V. Bushueva, R.R. Sakhautdinova, S.V. Klinova, **S.N. Solovyeva**, V.Y. Shur, E.V. Shishkina, I.E. Valamina, O.H. Makeyev, E.Y. Meshtcheryakova, V.G. Panov, A.N. Varaksin // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2018. Vol. 19, № 3. – P. 837.

СОЛОВЬЕВА Светлана Николаевна

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ОЦЕНКИ ОПАСНОСТИ СУБМИКРОННЫХ
ЧАСТИЦ АМОРФНОГО ДИОКСИДА КРЕМНИЯ АТМОСФЕРНОГО
ВОЗДУХА ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ**

3.2.1– гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать _____. Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. _____. Тираж 100 экз. Заказ № _____

Отпечатано в типографии _____
Адрес: _____