

Федеральное бюджетное учреждение науки «Екатеринбургский медицинский-  
научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

*На правах рукописи*

**РЯБОВА**

**Юлия Владимировна**

**ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА  
СЕЛЕНА ИЗОЛИРОВАННО И В КОМБИНАЦИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ  
ОКСИДА МЕДИ**

3.2.1. Гигиена

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель –

д-р мед. наук

Сутункова Марина Петровна

Екатеринбург – 2023

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ЭФФЕКТАХ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ НА ОРГАНИЗМ ПО ДАННЫМ НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
Резюме .....	26
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	27
2.1 Характеристика используемых наночастиц в экспериментах.....	27
2.2 Экспериментальное исследование <i>in vitro</i> .....	299
2.2.1 Моделирование интоксикации и использованные дозы .....	299
2.3.2 Методы оценки цитотоксических эффектов .....	29
2.3 Экспериментальное исследование <i>in vivo</i> .....	30
2.3.1 Моделирование интоксикации и использованные дозы .....	30
2.3.2 Методы оценки состояния организма подопытных животных.....	33
2.3.3 Биопротекторный комплекс .....	37
2.4 Математическая обработка данных .....	38
2.5 Анализ данных производственного контроля уровня содержания селена в воздухе рабочей зоны медеплавильного предприятия.....	40
Резюме .....	42
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ДАННЫХ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КОНТРОЛЯ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕЛЕНА В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ПРЕДПРИЯТИЯ .....	43
Резюме .....	47
ГЛАВА 4 ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА СЕЛЕНА ИЗОЛИРОВАННО И В КОМБИНАЦИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА МЕДИ.....	48

4.1 Оценка реакции глубоких дыхательных путей в ответ на однократное введение наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди.....	48
4.2 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди в условиях эксперимента <i>in vitro</i> на биоэнергетические процессы в организме .....	59
4.3 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди в условиях субхронического воздействия <i>in vivo</i> на биоэнергетические процессы в организме .....	62
4.4 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние печени.....	66
4.5 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние почек .....	73
4.6 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние иммунных органов .....	79
4.7 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние сердечно-сосудистой системы .....	82
4.8 Положительные эффекты наночастиц оксида селена при субхроническом воздействии.....	89
Резюме .....	92
<b>ГЛАВА 5 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ БИОПРОТЕКТОРОНОГО КОМПЛЕКСА, КУПИРУЮЩЕГО РАЗВИТИЕ ВРЕДНЫХ ЭФФЕКТОВ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ СЕЛЕНА И МЕДИ.....</b>	<b>94</b>
5.1 Обоснование выбора биопротекторов, купирующих развитие вредных эффектов при комбинированном воздействии наноксидов селена и меди.....	94

5.2 Испытание эффективности биопрофилактического комплекса при комбинированном воздействии наноксидов селена и меди .....	988
Резюме .....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	103
ВЫВОДЫ .....	105
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	1088
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	109
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	110

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования**

Селен и его соединения активно используются в хозяйственной деятельности, что подтверждается высокими мировыми объемами его добычи – 80-90 тысяч тонн в составе медных месторождений, которые являются основным источником селена [24].

Потенциальные и фактические риски для здоровья человека связаны с высокими объемами добычи селена и его широким применением. Некоторые производственные процессы связаны с образованием элементнооксидных наночастиц (ЭО НЧ), которые наряду с субмикронными частицами более 100 нм загрязняют рабочее место и окружающий воздух [10]. Литературные данные, полученные из открытых источников, свидетельствуют о том, что ЭО НЧ обладают при равном химическом составе более выраженным вредным действием на организм, чем частицы микрометрового диапазона либо ионы [36, 49, 96, 110, 119].

Профессиональный контакт с селеном и его соединениями, включая их ультрамалые частицы, встречается в металлургии – при переработке медных шламов, обжиге медного колчедана, производстве марганца, селена и теллура. Его используют для придания литой стали мелкозернистой структуры, улучшения механических свойств нержавеющей сталей. Селен применяют в стекольном производстве для обесцвечивания зелёного стекла и получения рубиновых стёкол, в производстве керамики, в резиновой и химической промышленности. Предполагается, что в дальнейшем сфера возможного контакта с селеносодержащими НЧ будет только расширяться в связи с использованием их в современных наукоемких областях, таких как электроника и оптоэлектроника.

Контакт человека с селеносодержащими НЧ может произойти из-за загрязнения ими окружающей среды либо ввиду целенаправленного их применения, а не ограничивается лишь производственной деятельностью. Предприятия медеплавильной промышленности являются мощными источниками поступления во внешнюю среду аэрозолей сложного состава, которые включают, в

том числе, соединения селена. Кроме того, практикуется целенаправленное применение специально синтезированных селенсодержащих наночастиц с заданными свойствами для нужд медицины и курортологии, науки, сельского хозяйства. При этом чаще учитывается положительное действие селенсодержащих НЧ, но не токсическое.

Принимая во внимание широкое применение селенсодержащих наночастиц, а также недостаточность данных об особенностях вредного действия селенсодержащих наночастиц для организма человека, настоящее диссертационное исследование представляется актуальным. Необходимо более глубокое изучение токсичности и потенциальной опасности селенсодержащих НЧ при различных путях поступления для разработки эффективных мер профилактики возможного негативного воздействия.

### **Степень разработанности темы исследования**

Двойственное действие селена на организм известно: его относят к числу жизненно важных микроэлементов [70, 72, 117, 128, 158, 149, 172], хотя ранее ему приписывали исключительно токсические свойства [172]. Не вызывает сомнений большая роль селена для нормального функционирования организма, хотя интервал между терапевтическими и токсическими дозами воздействия узок, и даже субтоксические дозы могут оказывать негативное воздействие на здоровье человека [188]. Селенсодержащие НЧ представляют особую ценность в качестве лечебно-профилактического средства, поскольку считается, что они проявляют высокую биодоступность при меньшей токсичности [90, 107, 213]. Тем не менее, в современной литературе в открытом доступе обнаруживаются единичные данные о токсических эффектах селенсодержащих НЧ [100, 101, 125, 207].

По результатам сбора и критического анализа данных немногочисленных экспериментальных исследований, обнаружены убедительные доказательства негативного воздействия селенсодержащих наночастиц на организм лабораторных животных по показателям общетоксического действия - снижение массы тела [101, 193, 207, 214, 221] и гепатотоксического (повышение активности печёночных

ферментов, повышенное накопление селена в печени) действия [56, 101, 125, 193, 196, 207, 214, 220, 221]. Наночастицы селена и его соединения могут оказывать влияние на различные органы и системы, помимо печени, являющейся основным органом-депо [202] и органом-мишенью [128] для токсического действия селена, наблюдались эффекты на репродуктивную [207], нервную [125], выделительную системы [207, 101], изменения углеводного [101], липидного [207] и белкового обменов [100]. Селен, будучи эссенциальным элементом, оказывал воздействие на селензависимые ферменты [101, 196, 214, 220, 221, 222].

Несмотря на представленные литературные данные, ряд научных вопросов освещен недостаточно. Не оценен потенциальный риск селенсодержащих НЧ для здоровья человека. Отсутствуют данные о селенсодержащих НЧ как о возможном вредном производственном факторе изолированно либо в комбинации с другими элементнооксидными НЧ.

### **Цель исследования**

Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наночастиц оксида селена при изолированной экспозиции и в комбинации с наночастицами оксида меди в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

### **Задачи исследования**

1. Провести статистический анализ данных производственного контроля уровня содержания селена в воздухе рабочей зоны селенового отделения медеплавильного предприятия.
2. Исследовать реакцию глубоких дыхательных путей в ответ на однократное интратрахеальное введение наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди, а также установить тип комбинированного действия этой смеси с применением метода математического моделирования.
3. Изучить влияние наночастиц оксида селена на биоэнергетические процессы в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

4. Исследовать воздействие на состояние печени, почек, сердечно-сосудистой системы наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди в субхроническом эксперименте *in vivo*, а также установить тип комбинированного действия этой смеси с применением метода математического моделирования.

5. Экспериментально оценить эффективность теоретически обоснованного комплекса биопротекторов, способствующих снижению химических рисков производственной среды для здоровья рабочих, связанных с воздействием наночастиц оксидов селена и меди.

### **Теоретическая значимость и научная новизна исследования**

Проведенные эксперименты *in vivo* и *in vitro* позволили установить, что наночастицы оксида селена обладают способностью снижать биоэнергетический потенциал клеток. В экспериментах *in vivo* установлено, что ведущим типом комбинированного токсического действия наночастиц оксида селена и наночастиц оксида меди является потенцирование при острой экспозиции и аддитивность при субхронической. Научно обоснованы эффективность и безопасность комплекса биопротекторов, способствующих снижению химических рисков производственной и окружающей среды за счет повышения резистентности организма к действию наночастиц оксидов селена и меди.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты диссертационной работы использованы при составлении Государственного доклада Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году».

Материалы диссертационной работы включены в программу образовательного процесса подготовки студентов медико-профилактического

факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Материалы диссертационной работы внедрены в экспериментально-исследовательскую работу и используются при чтении лекций на курсах усовершенствования врачей по гигиене и профпатологии при ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

Материалы диссертационной работы использованы в практической деятельности учреждений Роспотребнадзора в Свердловской области.

Материалы диссертационной работы использованы в отчетной документации в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России» (Рег.№ НИОКТР 121121300181-5, Рег.№ НИОКТР 121091400188-9, Рег.№ НИОКТР 121091400189-6).

На основании материалов диссертационного исследования разработан способ повышения устойчивости организма к комбинированному цитотоксическому действию наночастиц оксидов селена и меди как способа минимизации химических рисков производственной и окружающей среды для здоровья, получен патент РФ №2786819 от 26.12.2022.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Установлено, что однократное интратрахеальное введение наночастиц оксида селена в эксперименте *in vivo* вызывает приток общей клеточности и рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов. При комбинированном воздействии наночастиц оксида селена и меди наблюдается выраженная реакция глубоких дыхательных путей. Методами математического моделирования установлено, что ведущим типом острого комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди является потенцирование.

2. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлена способность наночастиц оксида селена нарушать биоэнергетические процессы клеток.

3. Доказано влияние наночастиц оксида селена в субхроническом эксперименте *in vivo* на состояние печени, почек, сердечно-сосудистой системы как изолированно, так и в комбинации с наночастицами оксида меди. Методами математического моделирования установлено, что ведущим типом субхронического комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди является аддитивность.

4. Устойчивость организма к комбинированному вредному воздействию наночастиц оксида селена и меди повышается при применении комплекса биопротекторов.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Комплексный подход к проблеме с применением современных методов исследования, а также адекватно подобранные методы математической обработки полученных данных обеспечивают в совокупности достоверность полученных результатов.

Корректное функционирование оборудования было обеспечено в соответствии с нормативными требованиями. Во всех помещениях соблюдались требуемые параметры микроклимата. Достоверность и репрезентативность результатов испытаний обеспечивали достаточным количеством наблюдений (в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах, *in vivo* на 192 крысах) и надлежащей статистической обработкой.

Материалы исследований, отражающие результаты диссертационной работы, доложены и обсуждены на 6 конференциях и форумах:

- II Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения» 20-21 октября 2021 г., г. Екатеринбург, Российская Федерация;

- XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы

эпидемиологии, микробиологии и гигиены», 21-24 июня 2022 г., оздоровительный комплекс «Лужки», Московская область, Российская Федерация;

- 4-й Международный молодежный форум «ПРОФЕССИЯ и ЗДОРОВЬЕ», 5-7 июля 2022 г., г. Светлогорск, Российская Федерация;

- Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Взаимодействие науки и практики. Опыт и перспективы», 6-7 октября 2022 г., г. Екатеринбург, Российская Федерация;

- Международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда», посвященной 95-летию республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», 24-25 ноября 2022 г., г. Минск, Республика Беларусь;

- Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы промышленной токсикологии и экологии», посвященной 100-летию со дня рождения выдающегося отечественного промышленного токсиколога, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента Российской Академии медицинских наук И.В. Саноцкого, 7 декабря 2022 года, г. Москва, Российская Федерация.

### **Личный вклад автора**

Автором организованы и проведены экспериментальные исследования *in vivo*, принято участие в экспериментах *in vitro*. Выполнен статистический анализ полученных данных. Обработанны данные производственного контроля содержания селена в воздухе рабочей зоны медеплавильного предприятия. Интерпретированы результаты, сформулированы выводы и практические рекомендации. Автором подготовлены публикации по результатам проведенных исследований. Личный вклад автора по всем разделам работы составляет не менее 85%.

### **Публикации**

По материалам диссертационного исследования было опубликовано 10 научных работ (в том числе 7 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства высшего образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертационных работ).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 135 страницах. Содержит введение, 5 глав, заключение, выводы, список сокращений, а также список литературы. Список литературы включает 222 источника, из которых 168 иностранных. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 23 рисунками.

## **ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ЭФФЕКТАХ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ НА ОРГАНИЗМ ПО ДАННЫМ НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

Опыт изучения действия на организм многих элементных и НЧ ЭО, накопленный рядом исследовательских коллективов [55, 66, 83, 103, 135], свидетельствует о том, что особенности и механизмы этого действия, с одной стороны, являются общими для этого класса веществ, поскольку связаны с их физико-химическими свойствами, определяемыми наноразмерностью, но с другой – определяются специфическими характеристиками НЧ-образующего химического элемента, качественно едиными в любой его химической форме. Несмотря на то, что большинство изученных наночастиц нерастворимы в воде, они хорошо растворяются в биологических средах [198], что обуславливает зависимость системной токсичности наночастиц от действия на организм соответствующего химического элемента в ионо-молекулярной форме [49, 206]. Исходя из вышесказанного, очевидна необходимость рассмотреть в этом разделе основные сведения о биологической активности селена, не ограничиваясь его наноразмерной формой.

Селен является незаменимым микроэлементом. Основная его функция состоит в построении активных центров белков и ферментов [8], в том числе участвующих в защите клеток от окислительных повреждений [70, 213]. Селен необходим для нормального функционирования иммунной [44, 69, 70, 174] и репродуктивной [138, 158, 166] систем. Будучи основным молекулярным синергистом йода, он является необходимым элементом для поддержания тиреоидного метаболизма [5, 70]. Выявлены антимуtagenная и антиканцерогенная активность селена [26, 141, 186], в том числе в отношении ряда органических веществ и некоторых тяжелых металлов [44]. Показаны положительные эффекты селена на организм при интоксикации некоторыми промышленными загрязнителями – в частности, замедление развития силикоза под воздействием селена [19].

Недостаток селена у животных сопровождается снижением массы тела, анемией, ухудшением состояния иммунной системы, печени (вплоть до цирроза), почек, яичников, экссудативным диатезом, снижением активности глутатионпероксидазы в эритроцитах и гранулоцитах, гемолизом эритроцитов. Нарушение сердечной деятельности проявляется в виде миодистрофии, кардиомиопатии [26, 51]. Биохимические признаки дефицита селена включают в себя снижение активности селен-зависимых ферментов в различных тканях и уменьшение дейодирования Т4 в печени [148]. У человека выраженный алиментарный недостаток селена встречается в эндемичных районах и протекает в виде болезни Кешана (поражение сердца, печени, скелетных мышц) и болезни Кашина-Бека (остеопатия, преимущественно детского возраста). В условиях дефицита наблюдается активация свободнорадикальных и развитие дистрофических процессов, что способствует миокардиодистрофии, атеросклерозу, ишемической болезни сердца, возникновению инфаркта миокарда [26]. Так же прослеживается связь дефицита селена и усиления опасности некоторых вирусных инфекций [8].

Наряду с известным положительным действием хорошо известны отрицательные эффекты селена. Токсическое действие селена на организм млекопитающих и человека характеризуется широким спектром функциональных, биохимических и морфологических нарушений. До 1957 года селен рассматривался лишь как токсичный компонент пищи, описывались многочисленные случаи отравлений селеном и его соединениями [26]. Известно, что вдыхание больших количеств дыма селена, диоксида селена или селенистого водорода приводит к отеку легких вследствие локального раздражающего действия на альвеолы [51].

Селен, в силу своей биологической близости к сере, но большей химической активности, постепенно замещает серу в ферментных системах, приводя к необратимым нарушениям в организме [51]. В схемах метаболических путей селена центральным метаболитом является селеноводород, наиболее токсичное его соединение. Механизм токсичности избытка селеноводорода, как и сероводорода,

по литературным данным, следующий: инактивация металлсодержащих ферментов, в первую очередь оксидаз (цитохромоксидазы, каталазы, пероксидазы), и повреждение молекул ДНК за счет активных форм кислорода (АФК) [44].

Острые отравления селеном в человеческой популяции встречаются редко и связаны зачастую с нерациональным потреблением витаминно-минеральных добавок [58, 173, 210]. Отравления селеном сопровождались снижением кровяного давления и уровня калия в сыворотке крови, удлинением интервала QT, депрессией сегмента ST, желудочковой тахикардией со стороны сердечно-сосудистой системы [173]; выпадением волос, обесцвечиванием или ломкостью ногтей [58, 149], головной болью, неприятным запахом изо рта, слабостью, негативными симптомами со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, диарея), кожной сыпью, мышечными болями и судорогами, болями в суставах [58]. Описан случай лабораторного воздействия селенистого водорода, в результате которого у химика развился отек легких и долго сохранялся цианоз с затруднением дыхания. В течение 22 дней при этом наблюдался тромбофлебит, и в течение 52 дней отмечались признаки поражения миокарда [47].

Согласно литературным данным, высокий уровень селена в крови увеличивает риск гипертонии, особенно у женщин [88]. Сообщается о более высокой частоте возникновения рака предстательной железы, кожи и диабета 2 типа людей, употребляющих селен - при уровне селена в плазме или сыворотке выше 140 мкг/л [211, 212]. Однако, до конца не ясно, способствует ли избыток селена развитию диабета 2 типа путем нарушения передачи сигналов и / или секреции инсулина, или, наоборот, нарушение регуляции углеводного обмена влияет на метаболизм селена [190, 191, 200].

Сложные метаболические процессы, происходящие с различными формами селена, и влияние других возможных антиоксидантов, поступающих в организм, затрудняют установку точной диетической потребности в селене [148]. В настоящее время нет критериев физиологической нормы для этого биотика. Чрезмерное применение селенсодержащих препаратов может привести к развитию гиперселеноза – состоянию, когда оксидантные свойства преобладают над

антиоксидантными [20]. По данным литературы среднесуточная потребность человека в селене варьирует от 70 до 100 мкг [51], от 55-70 мкг [32], от 40 мкг [148]. Известно, что интервал между терапевтическим и токсическим воздействием селена узок [117, 190, 210], и даже субтоксичные дозы могут оказывать негативные эффекты на здоровье [190]. Предельный уровень потребления селена по данным литературы составляет 600 мкг/сутки [51], что противоречит сведениям о возможном проявлении токсической дозы уже при потреблении 400 мкг/сутки [58, 213].

Многочисленные литературные данные, полученные из открытых источников, свидетельствуют о том, что ультрамалые частицы обладают выраженным вредным действием на организм. Поэтому, помимо производственно-обусловленного воздействия самопроизвольно возникающих селенсодержащих НЧ, вызывает опасение целенаправленное применение специально синтезированных селенсодержащих НЧ с заданными свойствами в медицине, сельском хозяйстве, растениеводстве [39, 40, 41, 52, 54, 71, 94, 101, 143, 144, 145, 162, 180, 196, 198] – при этом чаще учитываются их положительные эффекты, но не токсические.

В современной литературе широко распространены данные о положительных свойствах селенсодержащих НЧ – антибактериальных [141, 164], противоопухолевых [60, 90, 141, 186], антиоксидантных [113]. Ряд исследователей считают целесообразным использование наночастиц селена совместно с противоопухолевыми средствами, поскольку это не только позволяет ослабить токсические эффекты химиотерапевтических препаратов [90, 165], но и усиливает эффекты противоопухолевой терапии [90]. Их рассматривают в качестве потенциального лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [162].

В современной литературе имеются лишь единичные данные о токсических эффектах селенсодержащих НЧ. Они способны взаимодействовать с биологическими макромолекулами и надмолекулярными структурами: с

клеточными мембранами опухолевых клеток, проявляя цитотоксическое действие [181], с сывороточным альбумином человека, образуя конъюгаты [74].

Противоопухолевую активность селенсодержащих НЧ обуславливает их способность вызывать летальные изменения в опухолевых клетках [68, 59].

Показана способность селенсодержащих НЧ к накоплению в раковых клетках [178, 139], в том числе в митохондриях таких клеток [139]. Исследований, в которых была бы отражена способность (либо неспособность) селенсодержащих НЧ накапливаться в нормальных клетках, в открытой литературе обнаружено не было.

При остром воздействии селенсодержащих НЧ показаны гистологические изменения, а также изменения клеточной и метаболической активности у рыб *P. hypophthalmus* [121]. Воздействие селенсодержащих НЧ на протеомный и метаболомный профиль показано на радужной форели в исследовании Naderi M. и соавт [140].

Обнаружена способность селенсодержащих НЧ оказывать токсическое действие на ракообразных *D. magna* [189], на водоросли *P. malhamensi* [80]. Более того, обнаружено, что изучаемые НЧ в 5-10 раз более токсичны в воде озера по сравнению с культуральной средой [80].

По результатам сбора и критического анализа данных немногочисленных экспериментальных исследований, имеются убедительные доказательства негативного воздействия селенсодержащих НЧ на организм лабораторных грызунов по следующим показателям:

- изменение массы тела – снижение массы тела [193, 207, 214, 220, 221] либо скорости ее прироста [196];
- повышение активности печёночных ферментов – чаще аланинаминотрансферазы (АлАТ) [207, 214, 220, 221] и щелочной фосфатазы (ЩФ) [101, 207];
- рост концентрации селена в печени [56, 196, 125, 101] и, в меньшей степени, почках [56, 125];

- изменение показателей, характеризующих состояние системы антиоксидантной защиты организма [101, 196, 214, 220, 221];
- увеличение активности селензависимых ферментов [101, 196, 214, 220, 221, 222].

Масса тела лабораторных грызунов (мышей либо крыс) под влиянием селенсодержащих НЧ в сравнении с контрольной группой снижалась в дозах 0,5, 2, 4, 6, 8 мг НЧ Se/кг м.т. [193, 207, 214, 220, 221], не изменялась в дозах 0,2, 0,4, 0,5 мг НЧ Se/кг м.т. [100, 207]. Наблюдали снижение темпа прироста массы тела в дозе 5 мг НЧ Se/кг м.т. [101]. Снижение массы тела может быть характерным признаком интоксикации наноселеном [198], но не специфическим. Изменение массы тела наблюдается при большом числе патологических состояний, в том числе при интоксикации наночастицами золота [81, 208] и серебра [194], а также различными пестицидами [168].

Селенсодержащие НЧ оказывали влияние на состояние печени грызунов, что проявлялось в изменении активности печеночных ферментов в сыворотке крови. Наблюдали повышение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) [207, 214, 220, 221] (но иногда – снижение [101, 196]), ЩФ [101, 207]. Активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) либо не изменялась [101, 220] либо повышалась [207], либо понижалась [196].

При гистологической оценке печени [101, 214, 221] (таблица 1.1) заметных дистрофических изменений не наблюдалось, хотя отмечено, что высокие дозы селенсодержащих НЧ приводят к разрушению гепатоцитов [101].

Накопление в организме селенсодержащих НЧ отмечалось до значительного увеличения уровня селена в печени [56, 101, 125, 196] и почках [56, 125], но не головном мозге [56, 125], желудке, легких, мышцах, плазме крови, моче [56]. Поскольку токсическое действие наночастиц зависит от их химической природы [103], повышенное накопление НЧ селена в печени может быть объяснено особенностями метаболизма селена, при котором печень является основным органом-депо [202] и органом-мишенью для его токсического действия [128].

Тем не менее, накопление наночастиц в печени не является специфическим признаком интоксикации наночастицами селена, поскольку характерно для многих НЧ – например, НЧ золота [84], НЧ диоксида титана [115]. Печень действует как система биологической фильтрации, которая «захватывает» 30–99% введенных наночастиц из кровотока [142].

Таблица 1.1 – Гистологическая оценка эффектов селенсодержащих НЧ на печень лабораторных грызунов по данным литературы

Литературная ссылка	Доза селенсодержащих НЧ (мг Se/кг м.т.) и время экспозиции	Эффект, обнаруженный при гистологической оценке
[101]	0,5 и 1,5 в течение 28 дней	умеренная дистрофия паренхимы печени
[101]	3,0 в течение 28 дней	легкая дистрофия паренхимы с сохраненной трабекулярной организацией
[207]	2,0 либо 4,0 в течение 14 дней	патологические изменения разной степени, в основном включающие гиперплазию, отек
[101]	5,0 в течение 28 дней	паренхима печени с легким многоочаговым аутолитическим повреждением и признаками застоя
[214, 221]	5,0 в течение 7 дней	гидропическая дистрофия гепатоцитов, которая относится к обратимым и умеренным патологическим изменениям
[207]	8,0 в течение 14 дней	патологические изменения, включающая дегенерацию печени и очаговый некроз гепатоцитов

Показано влияние селенсодержащих НЧ на антиоксидантную систему организма. Дозозависимо снижался уровень восстановленного глутатиона в печени в дозе 6 мг НЧ Se/кг м.т. [220], что свидетельствует о дисбалансе окислительно-восстановительных реакций в печени и приводит к нарушению функционирования гепатоцитов. Содержание малонового диальдегида (МДА) либо снижалось в дозах 600 мкг/ кг м.т. НЧ Se в день в течение 90 дней и 6 мг НЧ Se/кг м.т. [220, 196], либо увеличивалось в дозе 5 мг НЧ Se/кг м.т. [214, 221], что

также свидетельствует о возможном оксидативном стрессе. Стоит отметить, что указанные эффекты наблюдались на приблизительно сопоставимых дозах селенсодержащих НЧ, изучаемых авторами. Активность супероксиддисмутазы (СОД) либо не изменялась в дозах 2, 4, 6 мг НЧ Se/кг м.т. [220], либо снижалась в дозах 200, 400 и 600 мкг/ кг м.т. НЧ Se в день в течение 90 дней и 5 мг НЧ Se/кг м.т. [101, 196]. Увеличивалась активность каталазы в дозе 4 мг НЧ Se/кг м.т. [220].

Изменения в системе антиоксидантной защиты также не являются характерной особенностью действия только лишь селенсодержащих НЧ. Индуцировать окислительный стресс способны, например, НЧ оксида кобальта [82], НЧ меди [85]. Опосредованно к увеличению продукции активных форм кислорода (АФК) может приводить активация макрофагов и нейтрофилов под влиянием НЧ золота [151], НЧ оксида цинка [115].

Увеличение активности селен-зависимых ферментов у лабораторных грызунов (крысы, мыши) неоднократно было отмечено при экспонировании к селенсодержащим НЧ: селенсодержащих форм глутатионпероксидазы в дозах 1,5, 2, 3, 4, 5, 6 мг НЧ Se/кг м.т. [101, 196, 214, 220, 221, 222]; тиоредоксинредуктазы в дозах 2, 4, 5, 6 мг НЧ Se/кг м.т. [196, 214, 221, 222], глутатион-S-трансферазы в дозах 2, 4, 5, 6 мг НЧ Se/кг м.т. [214, 220, 221]. Не ясно, является ли такое увеличение негативным признаком интоксикации селенсодержащими НЧ или проявлением важной роли селена как микроэлемента.

Под воздействием селенсодержащих НЧ в дозе 4 мг НЧ Se/кг м.т. наблюдалась локальная аллопеция [193], что согласуется с данными о способности селена вызывать потерю волос при остром отравлении [58]. Интересно, что более ни в одном из экспериментальных исследований аналогичного изменения не наблюдалось. Стоит отметить, что MacFarquhar J. K. и соавт. (2010) зафиксировали потерю волос у людей в 72% случаев при передозировке селенсодержащими витаминными препаратами в высокой дозе, равной 41 749 мкг/сутки при рекомендуемой 55 мкг/сутки. Доза, используемая Nadrup N. и соавт. (2019) тоже оказалась существенной для исследуемых крыс – на 9 сутки самкам и на 11 сутки самцам пришлось снизить дозу с 4 до 1 мг НЧ Se/кг м.т., а на 16 сутки обе группы

практически целиком пришлось умертвить по соображениям гуманности (в связи с выраженными признаками интоксикации, включающих аллопецию и снижение двигательной активности животных) [193].

Предполагается, что селенсодержащие НЧ способны нарушать метаболизм жирных кислот, белков [100], липидов [207] и углеводов [101]. Zhao Z. и соавт. (2016), исследуя возможное влияние высоких доз селена в рационе на развитие диабета у свиней, показали способность селена влиять на регуляцию белкового, углеводного и липидного обмена в дозе 3 НЧ Se/кг м.т. [108]. Индуцированное высоким потреблением селена накопление липидов в печени было связано со стимуляцией липогенеза и глюконеогенеза и снижением липолиза, отмечено увеличение концентрации белка в печени и мышцах [108]. В подтверждение возможной роли селена в нарушении углеводного обмена эпидемиологические исследования, проведенные на территории США в 2008-2010 годах, сообщают о связи высоких уровней селена в плазме крови с повышенной распространенностью диабета 2 типа, гипергликемией [190].

При гистологической оценке семенников крыс, подвергшихся пероральному воздействию селенсодержащих НЧ размером  $79,88 \pm 23,68$  нм в дозе 8 мг/ кг м.т. в течение 14 дней обнаружена атрофия семенных канальцев, отмечено нарушение сперматогенеза [207]. Это единственные данные о токсическом воздействии НЧ селена на репродуктивную систему, обнаруженные в литературе. Более того, обычно недостаток, а не избыток, соединений селена связывают с мужским бесплодием [150, 171], считают его необходимым для функционирования репродуктивной системы [215]. Но нельзя игнорировать такие данные и исключать влияние уровней селена, отличных от физиологической нормы – например, было выявлено снижение уровней мРНК генов, кодирующих транскрипционный фактор AP-1 («activating protein-1», собирательный термин, относящийся к гетеродимерным факторам транскрипции, состоящим из субъединиц семейства белков Jun и семейства белков Fos, что можно перевести как «активирующий белок-1») - cJUN (белок С субъединиц семейства белков Jun) и cFOS (белок С субъединиц семейства белков Fos) как при дефиците, так и при избытке селена, что

связано со снижением числа зародышевых клеток, дифференцировкой и снижением фертильности [184].

При гистологической оценке тимуса экспонированных к селенсодержащим НЧ крыс обнаружено истончение коры, нечеткость границы между корковым и мозговым веществом [207]. Обычно патологию тимуса связывают с дефицитом селена [219], хотя Peng и соавт. обнаружили, что избыточное потребление селена ( $> 5,0$  мг Se/кг м.т. для селенита натрия) может вызывать поражения тимуса и уменьшать субпопуляцию Т-клеток у цыплят-бройлеров [130]. Данных, касающихся непосредственно воздействия селенсодержащих НЧ на тимус, в открытой литературе, найдено не было.

При гистологической оценке почек крыс, подвергшихся пероральному воздействию селенсодержащих НЧ размером  $79,88 \pm 23,68$  нм в дозе  $8,0$  мг Se/кг м.т. течение 14 дней обнаружено сморщивание клубочков, что является признаком гломерулонефрита. В некоторых клетках почечных канальцев обнаружены признаки некробиоза [207]. Больше не было обнаружено данных о подобном пагубном влиянии селена и его соединений, включая наноразмерные формы, на почки.

Обнаружена способность селенсодержащих НЧ проникать через гематоэнцефалический барьер [125], но не накапливаться в головном мозге [56, 125]. При гистологической оценке головного мозга было обнаружено снижение количества астроглиальных клеток, что Lesnichaya M. и соавт. связывают с действием наночастиц селена на астроглиальные элементы сенсомоторной коры. Авторы предполагают, что такая избирательность может привести к существенным изменениям функционального состояния сенсомоторной коры в отдаленном постконтактном периоде [125]. Поражения мозга в этой области связывают с болезнью Паркинсона [87, 146, 155]. Причиной ее развития может быть как высокий, так и низкий уровень селена в организме [72], поскольку такой дисбаланс приводит к интенсификации окислительного стресса [61, 72, 120].

При пероральном воздействии селенсодержащих НЧ были обнаружены изменения слизистой оболочки кишечника различной степени выраженности, от

отсутствия деформации кишечных ворсинок в дозе 0,5 мг Se/кг до серьезных изменений слизистой оболочки в дозе 5,0 мг Se/кг [101]. В разовой дозе НЧ Se 1000 мг/кг м.т. вызывали деструктивные изменения в кишечнике (признаки начальной эрозии и десквамации эпителия; выраженная эозинофилия и обильная клеточная инфильтрация в зонах крипт). В разовой дозе НЧ 5000 мг/кг м.т. наблюдали признаки дезорганизации слизистой оболочки и мышечных слоев толстой кишки (поражение и лимфоидная инфильтрация слизистого слоя) [98]. Интересно, что при 90-дневной экспозиции в дозе 500 мг/кг м.т. каких-либо заметных изменений не было обнаружено [98].

Дозу селенсодержащих НЧ, не оказывающую явного нежелательного действия (NOAEL), приводит в своих исследованиях Jia X. и соавт. (2005) – для наночастиц стабилизированного бычьим сывороточным альбумином (БСА) красного аморфного элементарного селена размером 20-60 нм она составляет 0,22 мг/кг м.т. в день для самцов и 0,33 мг/кг м.т. в день для самок (для крыс линии Sprague-Dawley, в течение 13 недель при пероральном воздействии) [114]. Данные противоречат исследованию Hadrup N. и соавт. (2019), которые предположили уровень наименьшего наблюдаемого неблагоприятного воздействия (LOAEL) при дозе селенсодержащих НЧ, равной 0,05 мг/кг м.т. для крыс-самок линии Wistar, а NOAEL – еще ниже [193].

Среднесмертельная доза ( $LD_{50}$ ) селенсодержащих НЧ для крыс при пероральном воздействии по данным разных авторов составила свыше 36 мг/кг м.т. [196] либо свыше 5000 мг/кг м.т. [98]. Целью работы Khubulava S. и соавт. (2019) не являлось определение  $LD_{50}$ , исследование проводилось с использованием НЧ до 100 нм, обе группы (разовая доза 1000 мг/кг м.т. и 5000 мг/кг м.т.) включали в себя 1 крысу-самку и 2 крыс-самцов [98]. Хотя небольшое число животных представляется сопряженным с высокой вероятностью случайной ошибки, отсутствие летальности на указанных авторами дозах не вызывает сомнений.

Среднесмертельная доза селенсодержащих НЧ для мышей была неоднократно определена разными коллективами авторов (таблица 1.2).

Существенное влияние на результат могли оказать используемые модели, хотя разница в значении LD50 у Zhang Z. и соавт. (2019) [196], Zhang J.S. и соавт. (2001) [222], Wang H. и соавт. (2007) [214], Zhang J. и соавт. (2008) [221] невелика. Сопоставимое значение LD50, полученное Wang H. и соавт. (2007), Zhang J. и соавт. (2008) и Zhang J. S. и соавт. (2001) может быть обусловлено выполнением этих работ одним коллективом авторов на одной и той же линии мышей-самцов (Kunming), с использованием одних и тех же частиц – стабилизированного БСА красного аморфного селена размером 20-60 нм [214, 220, 222].

Таблица 1.2 – Среднесмертельная доза селенсодержащих НЧ для лабораторных мышей по данным литературы

Литературная ссылка	[222]	[214, 220]	[196]	[125]
Характеристика НЧ	НЧ стабилизированного бычьим сывороточным альбумином красного аморфного селена, 20-60 нм		Полисахоридно-белковый комплекс, содержащий селенсодержащие НЧ, синтезированные при помощи <i>P. tuber-regium</i> , 20 нм	Нанокompозит НЧ SeO <sub>2</sub> , стабилизированный биосовместимым полисахаридом к-каррагинаном, 6,8 и 24,5 нм
Линия лабораторной мыши	Мыши-самцы и самки линии Kunming		SPF мыши линии ICR, самцы и самки	Мыши-самцы нелинейные
Размер выборки	10 животных в каждой группе			
Величина LD 50	113,0 мг/кг м.т. (с 95% доверительным интервалом 89,9–141,9 мг/кг м.т.)	92,1 (с 95% доверительным интервалом 71,1–131,1) мг Se/кг м.т.	61,6 мг Se/кг м.т. для самок и 72 мг Se/кг м.т. для самцов	Свыше 2000 мг/кг м.т.

Работы, выполняемые Lesnichaya M. и соавт. [125] и Zhang и соавт. [196] имели некоторые различия в используемых селенсодержащих НЧ и линиях

животных. На результат оказала влияние как степень токсичности соединений селена, как и биодоступность, неодинакова для разного рода его соединений [212, 149]. Так, на крысах при пероральном введении установлена  $LD_{50}$  7 мг Se/кг массы тела для селенита натрия, 138 мг Se/кг для сульфидов селена, и 6700 мг Se/кг для элементного селена [149].

Учитывая приведенные данные, можно предположить, что разная степень токсичности неодинакова и для разных наноразмерных соединений селена. Авторами также не упоминается о белковой короне. В то же время известно, что образование белковых корон наночастиц вместе с биологической реакцией на эти короны важны для нанотоксикологии [97, 203], т.к. она оказывает существенное влияние на взаимодействие наночастиц с клетками, а значит на скорость их выведения из кровотока, токсичность, распределение в организме [16].

## Резюме

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что для селенсодержащих наночастиц, наряду с возможными проявлениями положительного действия на организм, связанного с важной ролью селена как биомикроэлемента, характерны и некоторые эффекты токсического действия на клеточном и органо-системном уровне, которые, однако, изучены недостаточно и в малом числе экспериментальных исследований, данные которых противоречивы.

Особенности действия комбинации селенсодержащих наночастиц с наночастицами других металлов (в частности, меди), которая характерна для загрязнения производственной и окружающей среды медеплавильной промышленности, не были обнаружены в открытых источниках.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Характеристика используемых наночастиц в экспериментах

Суспензии наночастиц оксидов элементов были получены специально для токсикологических экспериментов из тонких листовых мишеней соответствующих элементов (медь, селен) 99,99 % чистоты под слоем стерильной деионизированной воды (рисунок 2.1).

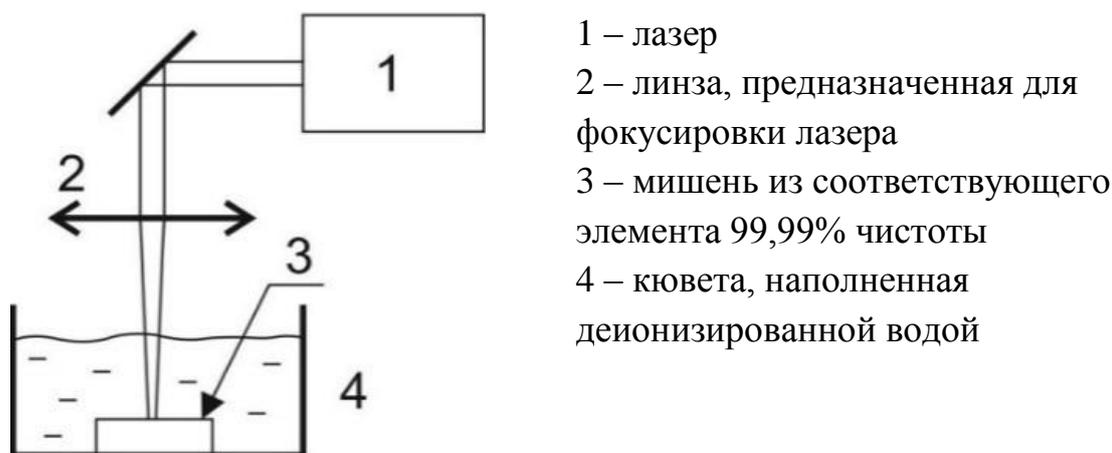


Рисунок 2.1 – Метод лазерной абляции, который применялся для получения водной суспензии наночастиц оксидов элементов

Форма и размер ЭО НЧ, использованных в экспериментальном исследовании, были охарактеризованы с применением метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ); химическая идентичность – с помощью конфокальной микроскопии комбинационного рассеяния. Величина дзета-потенциала, измеренная при помощи анализатора Zetasizer NanoZS (Malvern, UK), была высокой (вплоть до 42 мВ), что характеризовало стабильность суспензий ЭО НЧ. Благодаря последнему удалось повысить концентрацию суспензии путём частичного испарения воды при 50°C. Без изменения размера и химической идентичности НЧ SeO и НЧ CuO достигалась концентрация, равная 0,25 мг/мл.

Распределение частиц по размерам, как видно из графиков, приведенных на рисунках 2.2-2.3, было симметричным и укладывалось в нанодиапазон. На тех же графиках указаны средние размеры наночастиц. Хотя единичные НЧ ЭО всегда

имеют тенденцию к слипанию, однако образующиеся агрегаты были, как видно из СЭМ-изображений (рисунки 2.2-2.3), неплотными и, в основном, тоже наноразмерными. Форма использованных НЧ ЭО была близка к сферической.

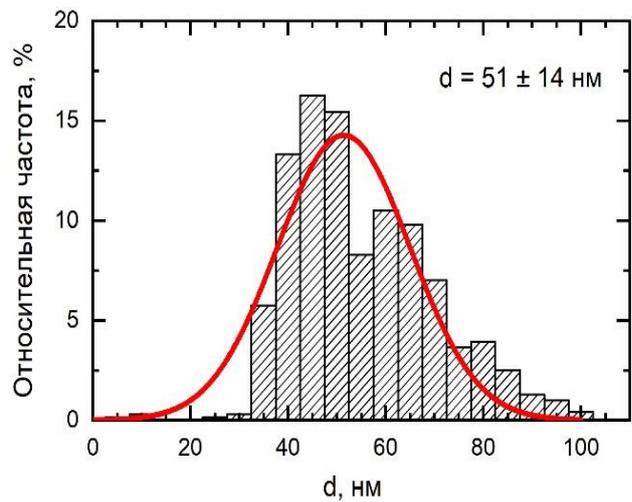
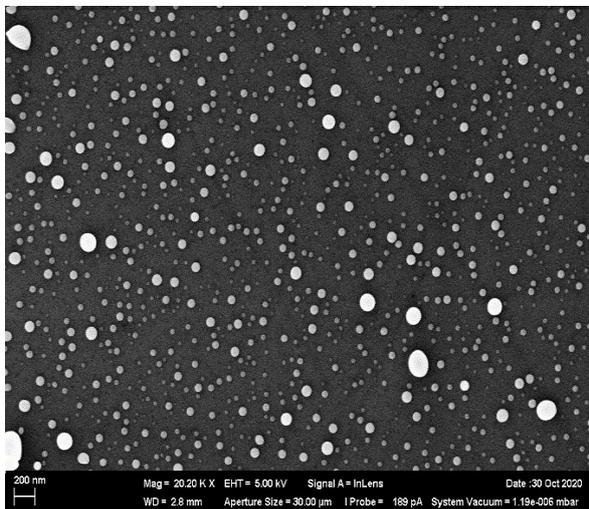


Рисунок 2.2 – НЧ SeO в суспензии (сканирующая электронная микрокопия, увеличение \*20 200) и график распределения частиц по диаметру

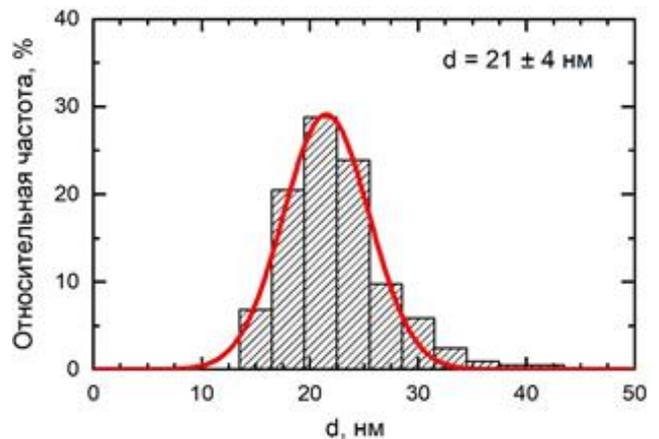
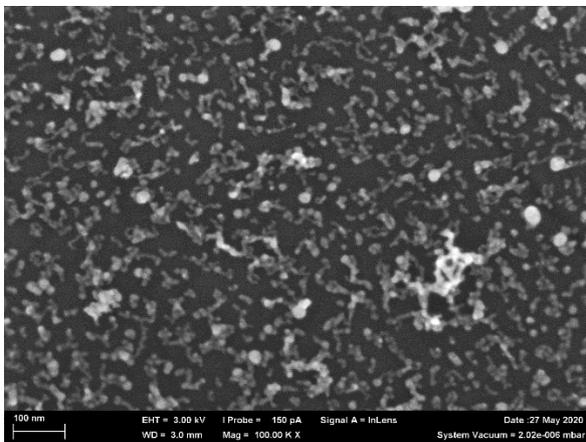


Рисунок 2.3 – НЧ CuO в суспензии (сканирующая электронная микрокопия, увеличение \*100 000) и график распределения частиц по диаметру

## 2.2 Экспериментальное исследование *in vitro*

### 2.2.1 Моделирование интоксикации и использованные дозы

Моделирование интоксикации в экспериментальном исследовании *in vitro* было выполнено на клеточной культуре линии ФЛЭЧ-104, которая является монослойной культурой фибробластоподобных клеток, полученных из лёгких 8-недельного эмбриона человека (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург, Россия).

Культуру клеток поддерживали в питательной среде DMEM, содержащей L-глутамин, 1 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,5% гентамицина при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Для оценки цитотоксического эффекта исследуемых наночастиц клетки высевали в 96-луночный планшет (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland), 70 000 клеток на лунку в 100 мкл среды, и инкубировали до получения монослоя в стандартных условиях в течение 48 ч. После получения монослоя в лунки добавляли суспензии НЧ ЭО и инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях перед проведением анализа АТФ. Конечная концентрация каждого типа НЧ в среде составляла 25–50–100 мкг/мл.

### 2.3.2 Методы оценки цитотоксических эффектов

Для количественной оценки цитотоксических эффектов НЧ ЭО в используемых концентрациях содержание АТФ в культуре определялось по люминесцентному сигналу с использованием реагентов Cell Titer-Glo (Promega Corporation, США). Рабочий раствор получали восстановлением лиофилизированного субстрата Cell Titer-Glo в буфере Cell Titer-Glo и нагревали до комнатной температуры на водяной бане. Порцию этого раствора по 100 мкл добавляли в каждую лунку, а затем планшет вращали в одной плоскости в течение 2 минут, чтобы вызвать лизис клеток. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре измеряли люминесценцию клеток с помощью люминометра LM-01T с программным обеспечением Kilia (Immunotech, Beckman

Coulter Company, Прага, Чешская Республика). Результаты измерений были представлены в относительных единицах люминесценции (RLU).

Митохондриальную функцию клеток оценивали с помощью набора для проведения клеточного МТТ-теста (Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Technologies, США, Калифорния). Основные параметры функции митохондрий определяли прямым измерением скорости потребления кислорода (пмоль  $O_2$ /мин) клетками с помощью анализатора клеточного метаболизма Agilent Seahorse XF (Agilent Technologies, США, Калифорния). Результаты обрабатывали с помощью программы Seahorse Wave (Agilent Technologies, США, Калифорния). Клеточный тест включал последовательное введение в клеточную среду следующих модуляторов: олигомицина, карбонилцианида-4-(трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) и ротенона + антимицина А. Инъекция олигомицина гиперполяризует митохондриальную мембрану, останавливая прохождение протонов через белковые комплексы. FCCP обращает гиперполяризованное состояние, вызванное олигомицином, путем переноса протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Ротенон и антимицин А ингибируют комплексы I и III, полностью останавливая митохондриальное дыхание. После каждого модулятора клеточное дыхание измеряется вновь.

## **2.3 Экспериментальное исследование *in vivo***

### **2.3.1 Моделирование интоксикации и использованные дозы**

Исследования на животных были одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (протокол №2 от 20.04.2021 г.). Животные содержались в условиях специально организованного и оборудованного вивария на базе ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора (ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с

требованиями ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Экспериментальное исследование с использованием лабораторных животных проводилось с учетом Хельсинской декларации и “International guiding principles for biomedical research involving animals”, разработанными the Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012).

Экспериментальные исследования проводились на 192 аутбредных белых крысах в возрасте около 4 месяцев (таблица 2.1.). Крысы делились на группы (по 10 крыс-самок (средняя масса составила  $222,43 \pm 1,48$  г, и не превышала  $\pm 20\%$  от средней массы всех животных) для острого эксперимента и по 12 крыс-самцов массой (средняя масса составила  $232,65 \pm 1,13$  г, и не превышала  $\pm 20\%$  от средней массы всех животных) для субхронического эксперимента. Каждая крыса получала групповую и индивидуальную метки, характеризующие принадлежность к группе и индивидуальный номер. Часть животных получали биопротективный комплекс (БПК).

Острую интоксикацию для оценки реакции альвеолярного фагоцитоза моделировали при помощи интратрахеального введения водных суспензий НЧ ЭО. Были использованы суспензии НЧ ЭО концентрацией 0,25 мг/мл. Объем введения составил: по 1 мл стерильной деионизированной воды для групп «Контроль интактный» и «Контроль после БПК»; по 1 мл соответствующих НЧ ЭО группам «НЧ SeO» и «НЧ CuO» (всего 1,25 мг/кг м.т. НЧ ЭО); по 0,5 мл суспензий CuO НЧ и SeO НЧ (суммарный объем введения составил 1 мл) группам «НЧ CuO + НЧ SeO» и «НЧ CuO + НЧ SeO+БПК» (всего 1,25 мг/кг м.т. НЧ ЭО).

Суспензии изучаемых частиц либо деионизированная вода, на которой были приготовлены эти суспензии, вводились под эфирным рауш-наркозом, под контролем зрения (с помощью специальной воронки и бинокулярных очков с подсветкой).

Субхроническая модель интоксикации была реализована (таблица 2.1) путем инъекций (внутрибрюшинно) исследуемых веществ (раздельно либо комбинированно) 3 раза в неделю в течение 6 недель. Для решения поставленных

в диссертационном исследовании задач, в особенности для апробации БПК, необходимы такие дозы, вредное действие которых будет явным, но не чрезмерно сильным. Для подбора таких доз перед планированием основного эксперимента был проведен «пилотный». В эксперименте были использованы следующие дозы НЧ ЭО: разовая доза 0,2 мг/кг м.т. либо суммарная 3,6 мг/кг м.т. («SeO НЧ 0,01»); разовая доза 1 мг/кг м.т. либо суммарная 18 мг/кг м.т. («SeO НЧ 0,5» либо «CuO НЧ 0,5»); разовая доза 2 мг/кг м.т. либо суммарная 36 мг/кг м.т. («SeO НЧ 1» либо «CuO НЧ 1»).

Таблица 2.1 – Дизайн проведенных экспериментов

Вариант эксперимента	Группы животных	Число жив.	Сумм. доза ЭО НЧ, мг/кг м.т.	Длит. эксп.	Способ введ.
Острая интоксикация	Контроль интактный	10	0	24 часа (1 введение ЭО НЧ)	Интра трахеально
	НЧ SeO	10	1,25		
	НЧ CuO	10	1,25		
	НЧ SeO + НЧ CuO	10	0,625 + 0,625		
	НЧ SeO + НЧ CuO + БПК	10	0,625 + 0,625		
	Контроль после БПК	10	0		
Субхроническая интоксикация	Контроль интактный	12	0	6 недель (18 введений ЭО НЧ)	Внутрибрюшинно
	НЧ SeO 0,01	12	3,6		
	НЧ SeO 0,5	12	18		
	НЧ SeO 1	12	36		
	НЧ CuO 0,5	12	18		
	НЧ CuO 1	12	36		
	НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 0,5	12	18 + 18		
	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5	12	36 + 18		
	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 1	12	36 + 36		
	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 1 + БПК	12	36 + 36		
	Контроль после БПК	12	0		

Для правильного введения вещества в брюшную полость крысу опускали головой вниз для смещения внутренностей брюшной полости к диафрагме. Введение инъекционной иглы производили перпендикулярно кожной складке в задней трети живота, несколько отступив от срединной линии.

Интратрахеальная модель была выбрана в качестве основы для моделирования острой интоксикации и оценки цитотоксического действия НЧ оксидов селена изолированно и в комбинации. Внутривентриальная модель была выбрана в качестве основы для моделирования субхронической интоксикации как сочетающаяся точность индивидуальной дозировки и способная обеспечить изолированное и комбинированное воздействие двух факторов, к тому же в разных дозах, параллельно на большом количестве численно наполненных групп.

Дозы, использованные в экспериментах, в дальнейшем для краткости закодированы соответственно таблице 2.1.

### **2.3.2 Методы оценки состояния организма подопытных животных**

Реакция альвеолярного фагоцитоза в остром эксперименте оценивалась путем проведения бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) через 24 часа после однократного интратрахеального введения. У крыс под гексеналовым наркозом в препарированную трахею вводилась канюля, соединенная со шприцом Люэра, содержащим 10 мл физиологического раствора. Жидкость поступала в легкие медленно под тяжестью поршня при вертикальном положении животного и шприца. Затем крыса и шприц поворачивались на 180°, и бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ) частично перетекала обратно в шприц. Объем БАЛЖ фиксировали, БАЛЖ помещалась в охлажденные пробирки.

Аликвотная проба БАЛЖ набиралась в меланжер для белых кровяных телец месте с метиленовым синим, растворенным в 3% уксусной кислоте. Подсчет клеток велся с помощью камеры Горяева при оптической микроскопии. Остальной объем БАЛЖ центрифугировали в течение 4 мин. при 200 g, затем жидкость декантировалась, а из осадка готовились мазки на два предметных

стекла. После просушивания на воздухе мазки фиксировались метиловым спиртом и окрашивались азур-эозином. Мазки микроскопировались с иммерсией при увеличении  $\times 1000$ . Дифференциальный подсчёт для определения процента альвеолярных макрофагов (АМ), нейтрофильных лейкоцитов (НЛ) и прочих клеток проводился до общего числа подсчитанных клеток, равного 100. С учётом общего числа клеток в БАЛЖ эти проценты пересчитывались на абсолютное число АМ и НЛ.

Биохимические показатели надосадочной жидкости отцентрифугированного БАЛЖа, такие как: амилаза, аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспаратаминотрансфераза (АсАТ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП), глюкоза определены на биохимическом анализаторе «Кобас Интегра» с использованием соответствующих диагностических наборов.

С помощью спонтанного теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в модификации Киселевой Е.П. и Полевщикова А.В. [18] исследовалось состояние кислородзависимого механизма фагоцитов, которое характеризует состояние и степень активации внутриклеточной НАДФ-Н-оксидазной системы. Принцип метода основан на восстановлении поглощённого фагоцитом растворимого красителя НСТ в нерастворимый диформазаан под влиянием супероксиданиона (предназначен для внутриклеточного уничтожения инфекционного агента после его поглощения), образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции.

Для оценки интенсивности и активности фагоцитоза пробу БАЛЖ смешивали с взвесью латекса (размер частиц 1,5 мкм), инкубировали в течение 20 минут при  $37^{\circ}\text{C}$ , окрашивали по Романовскому-Гимзе. Активность фагоцитоза (АФ) оценивали по проценту клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа. Индекс фагоцитоза (ИФ) оценивали по среднему числу частиц латекса, поглощенных в расчете на одну клетку [23].

Для оценки степени интоксикации в субхроническом эксперименте в конце экспозиционного периода, на протяжении которого проводилось наблюдение за общим состоянием крыс, еженедельно осуществлялся контроль веса животных (последнее взвешивание непосредственно перед умерщвлением) исследовали

физиологические, цитологических и биохимических показатели состояния организма контрольных и подопытных животных.

В середине 5-й недели эксперимента оценивали состояние сердечно-сосудистой системы с помощью неинвазивной регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) и параметров артериального давления (АД) с использованием систем *ecgTUNNEL* (emka TECHNOLOGIES, Париж, Франция) и *CODA-HT8* (Kent Scientific, Торрингтон, США) соответственно.

Высшая нервная деятельность животных характеризовалась показателями в модели «Открытое поле». Оценивалось число пересеченных квадратов за 3 минуты [28,181]. Была выполнена регистрация суммационно-порогового показателя [48].

Раздельный сбор мочи на протяжении 24 часов проводился для оценки диуреза и биохимических показателей с помощью полуавтоматического анализатора мочи *CLINITEK Status* (Siemens Healthcare Diagnostics) – уровень креатинина, мочевой кислоты, мочевины, концентрация общего белка; либо рутинными методиками – уровень копропорфирина в моче [187].

После умерщвления животных было проведено препарирование с визуальным осмотром внутренних органов. Масса сердца, печени, селезенки, почек, головного мозга была зафиксирована.

Оценка коэффициента фрагментации ДНК (под руководством проф. О.Г. Макеева) проводилась методом анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ) в ядерных клетках циркулирующей крови. Этот метод используется во многих исследованиях [93, 95, 185].

Метаболомный скрининг проводился с использованием ВЭЖХ-МС. Детектирование осуществляли времяпролетным масс-спектрометром. Полученный массив данных по всем пробам обрабатывали с помощью программного обеспечения, позволяющего выделить статистически значимые изменения содержания метаболитов посредством обработки данных методом главных компонент. Для каждой экспериментальной группы был получен набор значений  $m/z$ , статистически значимо изменивших интенсивность в сравнении до и после проведения эксперимента. Для данных масс проводили аннотацию посредством

повторного анализа на масс-спектрометре в тандемном режиме с разными уровнями энергий фрагментации для получения характеристических фрагментных спектров и расшифровки структуры. Анализ полученных спектров проводили с использованием общедоступных баз данных (HMDB, MoNA, METLIN, MassBank EU), а также *in silico* инструментов фрагментации (MetFrag, CFM-ID, MS-FINDER).

С помощью автоматического гематологического анализатора MYTHIC-18 определяли гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, тромбоцит, тромбоциты, лейкоциты, эритроциты.

В мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе, подсчитывалась лейкоцитарная формула крови, а при суправитальной окраске бриллиант-крезиловым синим подсчитывали число ретикулоцитов на 1000 эритроцитов [27]. Определяли активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови (СДГ) цитохимическим методом с использованием пара-нитросинего тетразолия и выражали количеством гранул формазана в 50 клетках [33].

Измеряли содержание общего белка, белковых фракций (альбуминов и глобулинов) и их соотношение, активность аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) [27], креатининкиназы, содержание холестерина высокой и низкой плотности, церулоплазмينا [3] и МДА [1], ГГТП, содержание креатинина, и кальция в сыворотке крови, содержание восстановленного глутатиона в цельной крови [2], SH-групп в плазме крови [102].

Ультраструктура клеток оценивалась с использованием электронного микроскопа в режиме STEM. Степень повреждения митохондрий определялась по классификации Mei G. Sun исходя из морфологических характеристик (матриксное пространство, количество крист) [86]. К нормальным относили митохондрии типа А (нормальные) и В (нормально-везикулярные), в то время как типы С (везикулярные), D (везикулярно-вздутые), Е (вздутые) считали патологически измененными.

Цитологический анализ тканевых отпечатков был проведен под руководством к.м.н. Сахаутдиновой Р.Р. Мазки-отпечатки, приготовленные с

поперечных срезов внутренних органов, высушенные при комнатной температуре и окрашенные по Лейшману, оценивались в световом бинокулярном микроскопе Carl Zeiss Primo Star с системой визуализации видеокамерой USCMOS при увеличении  $\times 100$  и  $\times 1000$ . Оценивали клеточный состав и признаки повреждения клетки, подсчитывая 100 клеток с каждого мазка лимфоузлов и 300 клеток с мазков остальных органов.

Гистологические изменения в субхроническом эксперименте в паренхиматозных органах (печень, почки) изучены под руководством к.м.н. Валаминой И.Е. Количественная оценка некоторых изменений проведена морфометрически с использованием сетки Автандилова и компьютерной программы распознавания образов [9, 13, 21].

### 2.3.3 Биопротекторный комплекс

По две группы крыс, получавших комбинированную токсическую нагрузку (группа «НЧ CuO + НЧ SeO + БПК» в остром и группа «НЧ CuO 1+ НЧ SeO 1+ БПК» в субхроническом эксперименте) и без интоксикации («Контроль после БПК» в остром и «Контроль после БПК» в субхроническом эксперименте) получали *per os* БПК (таблица 2.2).

Энтеросорбент – яблочный пектин (ООО «Промавтоматика», г. Белгород, Россия) добавляли к части корма крыс в количестве, соответствующем дозе 200 мг на крысу. Крысы получали глютамат (АО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, Россия) в виде 1,5% раствора вместо питьевой воды *ad libitum*. Препараты, включая витамины и минералы – Глицин (ООО «Биотики», г. Москва, Россия), Аскорутин (ООО «Марбиофарм», Йошкар-Ола, Россия), Аквадетрим (АО «Акрихин», г. Старая Купавна, Россия), Витамин B12 («Solgar Inc.», Leonia, New Jersey, USA) – доступные в виде таблеток, были измельчены и добавлены к другой порции корма в количествах, соответствующих рекомендуемой суточной дозе этих микроэлементов для крыс (там, где такие рекомендации были известны только для людей, пересчет потребности для крыс был сделан на основе межвидового

соотношения метаболизма). Мы также использовали препарат рыбьего жира «Янтарная капля» (ООО «Экко плюс», г. Жуковский, Россия), в состав которого помимо ПНЖК  $\omega$ -3 включены витамины А и D.

Таблица 2.2 – Дозировки и способы получения животными препаратов биопротекторного комплекса

Биопротектор	Дозировка и способ получения
Пектин (яблочный)	200 мг на крысу (с кормом)
Глутамат натрия	160 мг на крысу (как 1,5% раствор в питье)
Глицин	12 мг на крысу (с кормом)
Витамин С	1,4 мг на крысу (с кормом)
Витамин D3 (холекальциферол)	1,04 мкг на крысу (с кормом)
Витамин А	0,0013 мг на крысу (с кормом)
Витамин B12 (цианкоболамин)	0,69 мкг на крысу (с кормом)
Рутин	1,4 мг на крысу (с кормом)
Смесь $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот	с преобладанием докозагексаеновой кислоты, не менее 45 %, и эйкозапентаеновой кислоты, не менее 40 %, общим объемом 13,3 мг (с кормом)

Мы предположили, что введение крысам диетической добавки, состоящей из указанных в Таблице 2.2 компонентов, будет отвечать возросшим потребностям организма животных, связанным с интоксикацией. При этом необходимо было проверить, не вызовет ли скомпонованная диетическая добавка неблагоприятные последствия, и поэтому в каждом экспериментальном исследовании одна группа крыс получала точно такой же БПК, но не подвергалась токсической нагрузке.

#### 2.4 Математическая обработка данных

*Статистическая значимость межгрупповых различий* средних значений всех полученных показателей оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента с

поправкой на множественные сравнения. Различия считались статистически значимыми при уровне случайности  $p < 0,05$ .

t-критерий Стьюдента был выбран поскольку хорошо известно, что он устойчив к слабым и умеренным отклонениям от нормальности, и даже при сравнительно небольшом объеме выборки (10-20 значений) выводы для t-критерия Стьюдента остаются в основном справедливыми для различных распределений случайных величин [35, 129, 132]. Кроме того, на выборках небольшого объема редко удается достаточно уверенно утверждать, что они подчиняются тому или иному распределению, и в большинстве случаев представляется корректным считать, что данные можно считать извлеченными из приближенно нормального распределения.

*Математическое описание комбинированной токсичности* было выполнено с использованием методологии построения поверхности отклика (the Response Surface Methodology – (RSM), обобщающей методы ANOVA и математической теории организации эксперимента [37, 38]. Согласно этой методологии, уравнение (1), описывающее поверхность отклика  $Y = Y(x_1, x_2)$ , может быть построено подбором его коэффициентов к данным эксперимента:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1),$$

где  $Y$  есть количественный эффект токсической экспозиции;  $x_1$  и  $x_2$  - дозы веществ, входящих в комбинацию.

Принимается, что два агента вызывают однонаправленный эффект, если обе функции ответа  $Y(x_1, 0)$  и  $Y(0, x_2)$  либо увеличиваются, либо уменьшаются при увеличении значения  $x_1$  или  $x_2$ ; если же при этом одна функция увеличивается, а другая уменьшается, действие принимается противонаправленным. Математическая модель, представленная уравнением (1), позволяет предсказывать величину отклика  $Y$  для любой комбинации доз в пределах экспериментального диапазона фактических доз каждого фактора. При виртуальном сечении поверхности отклика на разных уровнях, соответствующих разным значениям

эффекта  $Y$  или доз  $x$ , получаем семейство изобол Лёве, которые могут иметь одну и ту же либо разную форму (прямую, выпуклую или вогнутую) и один и тот же либо противоположный наклон, что делает интерпретацию типов бинарного комбинированного действия простой и наглядной.

Для определения типа зависимости доза-реакция экспериментальные данные для конкретного показателя результата должны быть аппроксимированы соответствующим функциональным выражением. Однако выбор аппроксимирующих функций не определяется однозначно даже в тех случаях, когда зависимость отклика от дозы вещества монотонна. Проблема становится еще более сложной, когда эта зависимость немонотонна.

Монотонная доза-реакция часто описывается функцией Хилла (2), пропорциональной кумулятивной функции лог-логистического распределения [114]:

$$y = b_0 + \frac{b_1}{1 + (b_2 x)^{b_3}} \quad (2),$$

где  $b_0, \dots, b_3$  – параметры, определяемые методом наименьших квадратов по экспериментальным данным.

Другая математическая модель монотонной зависимости представляет собой гиперболическую функцию (3), связанную с уравнением Михаэлиса–Ментен, которое используется, например, для описания скорости ферментативных реакций [120]:

$$y = \frac{b_0 + b_1 x}{b_2 + b_3 x}, \quad (3)$$

## **2.5 Анализ данных производственного контроля уровня содержания селена в воздухе рабочей зоны медеплавильного предприятия**

Информация об условиях труда рабочих медеплавильного предприятия получена по данным производственного контроля, осуществляемого

предприятием в соответствии с требованиями СП 1.1.1058-01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением Санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и СП 2.2.3670-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда» в период с 2019 по 2021 год силами собственной аккредитованной лаборатории и испытательно-лабораторного центра ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области». Материалы для статистической обработки запрошены в ходе формирования статистической отчетности для подготовки государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации» в соответствии с требованиями Постановления Правительства РФ от 23 мая 2012 г. N 513 «О государственном докладе о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации».

Статистическая обработка полученных данных и построение графиков осуществлялась диссертантом самостоятельно с использованием методов статистического анализа в пакетах прикладных программ Ms Excel 2016.

## Резюме

Дана краткая характеристика элементнооксидных наночастиц и методов оценки их воздействия на клеточной культуре эксперименте *in vitro* и на крыс в остром и субхроническом экспериментах *in vivo*. Приведен состав биопротекторного комплекса, включая дозы входящих в него компонентов. Указаны способы статистической и математической обработки полученных данных.

### **ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ДАННЫХ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КОНТРОЛЯ УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕЛЕНА В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ПРЕДПРИЯТИЯ**

Селен и его соединения активно используются в хозяйственной деятельности, что подтверждается высокими мировыми объемами его добычи - 80-90 тысяч тонн только в составе медных месторождений [24]. Селен используют для придания литой стали мелкозернистой структуры, улучшения механических свойств нержавеющей сталей. Селен применяют в стекольном производстве для обесцвечивания зелёного стекла и получения рубиновых стёкол, в производстве керамики, в резиновой и химической промышленности [213].

Селен может быть получен, в основном, при комплексной переработке различных видов сульфидного сырья, получаемого на медно-никелевых рудах Заполярья и колчеданных медно-цинковых рудах Урала [24]. Основными (на 90 %) промышленными источниками селена служат шламы, образующиеся при электролитическом рафинировании анодной меди [22, 24].

Селен является типичным представителем группы редких и рассеянных элементов и, за редчайшим исключением, не имеет собственных месторождений [24], однако, будучи химическим аналогом серы, содержится во многих природных сульфидных минералах [24, 25], включая медные. Основная форма селена в медных рудах — изоморфное замещение серы в сульфидах. В процессе окисления сульфидных месторождений селен, в отличие от серы, не переходит в водную фазу, поэтому часть селена выделяется в самородном виде, в котором он в редких случаях обнаруживается в зоне окисления сульфидных месторождений [24].

Медьэлектролитные шламы, являясь многокомпонентным сырьём, содержат как «целевые» (драгметаллы и халькогены (селен и теллур)), так и «балластные» (медь, свинец, сурьма и мышьяк) компоненты. Для халькогенов, к каковым относится селен, наблюдается значительное улетучивание при высокотемпературной обработке. При обжиге медного концентрата в печи кипящего слоя переход селена в газовую фазу составляет 45–60 %. Еще большее

улетучивание селена наблюдается при обжиге пиритного концентрата: обжиг в многоподовой печи сопровождается улетучиванием 84 % селена. Все закономерности, отмеченные для процессов обжига, справедливы и для процессов плавки руд и концентратов. Медно-серная плавка обеспечивает извлечение основной массы селена в газовую фазу, вследствие чего наблюдается высокое его содержание в газовой среде. Шахтная плавка рудного никелевого агломерата, применяемая ранее на Норильском комбинате, характеризуется улетучиванием 20 % селена. В газы и пыль при шахтной плавке на Карабашском медеплавильном заводе переходит до 60 % селена. Особенно велика степень улетучивания селена в интенсивных процессах плавки во взвешенном состоянии на кислородном дутье и циклонной плавке, соответственно 60–70 и 90 %. Во втором периоде конвертирования медных штейнов на уральских медеплавильных заводах наблюдается улетучивание 1–2 % селена то время как при втором периоде конвертирования медного-никелевого штейна возгоняется до 12–17 %. Конечные стадии пиromеталлургического передела связаны с относительно небольшими потерями: например, при огневом рафинировании меди степень улетучивания селена не превышает 10–12 % [24].

Проведен статистический анализ данных производственного контроля содержания селена и его соединений в воздухе рабочей зоны селенового отделения медеплавильного предприятия, согласно которому работники селенового отделения (профессия – аппаратчик в производстве редких металлов) подвергаются воздействию аэрозолей сложного состава, содержащей селен, с.с. ( $2,51 \pm 0,09$  мг/м<sup>3</sup>, что превышает уровень ПДК на 25,5%), селена диоксид, с.с. ( $0,21 \pm 0,01$  мг/м<sup>3</sup>, что превышает уровень ПДК на 110 %), и селен диоксид (не превышает уровень ПДК) (рис. 3.1).

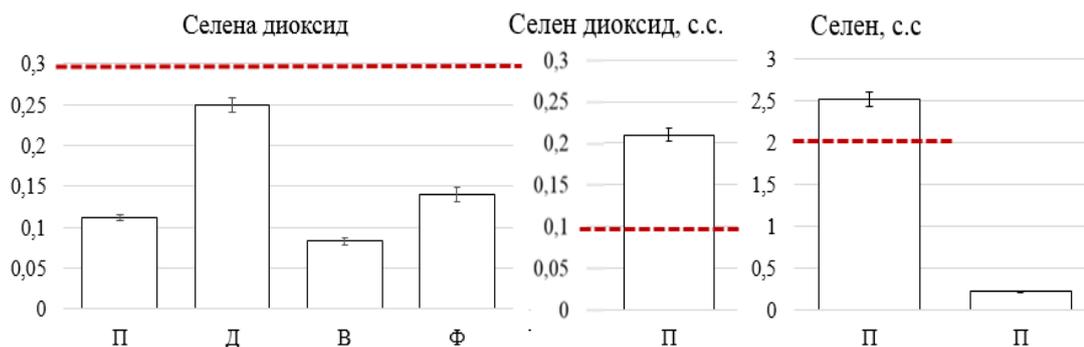


Рисунок 3.1 – Результаты контроля за условиями труда рабочих на медеплавильном предприятии (селеновое отделение). На оси абсцисс указана концентрация контролируемого производственного фактора в воздухе рабочей зоны, мг/м<sup>3</sup>. Красная горизонтальная линия обозначает величину ПДК для каждого соединения согласно ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Буквенные обозначения на оси ординат указывают на рабочее место аппаратчика в производстве редких металлов, где «П» – печь плавки селена; «Д» – помещение дробилок и мельниц; «В» – установки возгонки и гранулирования селена; «Ф» – нутч-фильтры

Во многих производственных процессах образуются элементнооксидные наночастицы (НЧ ЭО), которые наряду с субмикронными частицами более 100 нм загрязняют рабочее место и окружающий воздух [10]. Согласно Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 «Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании гарант» к источникам наноаэрозолей в производственной среде относятся все высокотемпературные процессы (рафинирование и обработка, горение), некоторые процессы механической обработки материалов (высокоскоростное измельчение и обработка) [10].

Как показано ранее, присутствие в воздухе рабочей зоны частиц менее 100 нм наряду с субмикронными частицами более 100 нм характерно и для медеплавильного производства [46, 53, 195]. Работники такого производства подвергаются комбинированному воздействию селена и меди, в том числе в

наноформе. В частности, особенности распределения по размерам частиц, отобранных на мембранный фильтр из воздуха рабочей зоны при плавке черновой (анодной) [53] и рафинированной (катодной) [195] меди. Исходя из данных литературы, около 55 % частиц, отобранных из воздуха рабочей зоны при разливке анодной меди, а также около 60% частиц, отобранных из воздуха рабочей зоны при плавке и литье катодной меди, относятся к наноразмерному диапазону от 0 до 100 нм [46, 53, 193]. Ранее было продемонстрировано, что соотношение атома металла и кислорода было близким к 1:1, что свидетельствует в пользу присутствия в воздухе рабочей зоны именно ЭО НЧ [193]. Литературные данные свидетельствуют о том, что НЧ ЭО обладают при равном химическом составе более выраженным вредным действием на организм, чем частицы микрометрового диапазона либо ионы [4, 36, 49, 96, 110, 119].

Контакт человека с селенсодержащими НЧ не ограничивается производственной деятельностью, он может произойти из-за загрязнения ими окружающей среды либо ввиду целенаправленного их применения в других сферах. Предприятия медеплавильной промышленности являются мощными источниками поступления во внешнюю среду аэрозолей сложного состава. Практикуется целенаправленное применение специально синтезированных селенсодержащих НЧ с заданными свойствами для нужд медицины и курортологии [94], науки [196, 162, 143, 101], сельского хозяйства [39, 40, 41, 52, 54, 143]. Предполагается, что в дальнейшем сфера возможного контакта с селенсодержащими НЧ будет только расширяться в связи с использованием их в современных наукоемких областях, таких как электроника и оптоэлектроника [22], и в медицине [71, 180, 199].

## Резюме

Селен относится к группе редких и рассеянных элементов и обычно не имеет собственных месторождений. Он содержится во многих природных сульфидных минералах, включая медные. Профессиональный контакт с селеном, медью и их соединениями, включая наноразмерные формы, встречается в металлургии - при переработке медных шламов, обжиге медного колчедана, производстве марганца, селена и теллура.

## ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА СЕЛЕНА ИЗОЛИРОВАННО И В КОМБИНАЦИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА МЕДИ

### 4.1 Оценка реакции глубоких дыхательных путей в ответ на однократное введение наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди

В результате однократного интратрахеального введения наночастицы оксида селена *in vivo* вызывают приток общей клеточности (таблица 4.1.1), рост фагоцитарной активности АМ (таблица 4.1.3). Не изменился биохимический состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа (таблица 4.1.2). Указанные изменения могут быть следствием самого по себе интратрахеального введения малорастворимых частиц.

Таблица 4.1.1. – Число клеток в жидкости, полученной при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксида селена либо деионизированной воды ( $X \pm Sx$ )

Цитологические показатели		Число клеток* $10^6$				Отношение НЛ/АМ
		общее	лимфоциты	НЛ	АМ	
Группы крыс	Контроль	3,62 ± 0,35	0,13 ± 0,03	0,68 ± 0,11	2,57 ± 0,19	0,26 ± 0,04
	НЧ SeO	5,35 ± 0,72 *	0,29 ± 0,07	1,30 ± 0,26	3,11 ± 0,1	0,53 ± 0,13

*Примечание:*

Статистически значимое отличие \* - от контрольной группы ( $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента)

В отличие от многих экспериментов с другими металлооксидными наночастицами [152, 195, 205, 206] при интратрахеальном введении НЧ SeO не наблюдались изменений биохимических показателей надосадочной жидкости БАЛЖ, типичных для реакция глубоких дыхательных путей в ответ на введение малорастворимых частиц (таблица 4.1.2).

Таблица 4.1.2. – Биохимические показатели надосадочной жидкости, полученной при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксида селена либо деионизированной воды ( $X \pm S_x$ )

Биохимические показатели		АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	Амилаза, Е/л	ГГТП, Е/л	ЛДГ, Е/л
Группы крыс	Контроль	1,98 ± 0,28	11,18 ± 1,51	2,63 ± 0,06	1,57 ± 0,36	34,29 ± 2,10
	НЧ SeO	1,83 ± 0,18	8,67 ± 1,54	3,24 ± 0,64	5,18 ± 2,01	25,56 ± 5,31

При интратрахеальном введении суспензии НЧ SeO наблюдали увеличение процента АМ, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа и увеличение среднего числа частиц латекса, поглощенных одним АМ. Такие изменения могут быть итогом непосредственно интратрахеального введения малорастворимых частиц.

Таблица 4.1.3. – Показатели фагоцитоза НЛ и АМ, полученных при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксида селена либо деионизированной воды ( $X \pm S_x$ )

Показатель		Активность фагоцитоза (% клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа)		Индекс фагоцитоза (среднее число частиц латекса, поглощенных одной клеткой)		НСТ-тест, % восстановленных фагоцитом гранул растворимого красителя НСТ в нерастворимый диформазан
		АМ	НЛ	АМ	НЛ	
Группы крыс	Контроль	10,60 ± 0,60	9,40 ± 0,40	1,19 ± 0,08	1,06 ± 0,02	1,43 ± 0,20
	НЧ SeO	20,63 ± 2,73 *	13,80 ± 2,15	2,04 ± 0,30 *	1,50 ± 0,25	1,50 ± 0,19

*Примечание:*

Статистически значимое отличие \* - от контрольной группы ( $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента)

Результаты НСТ-теста не отличались от контрольных значений, что свидетельствует об отсутствии изменений во внутриклеточной НАДФ-Н-оксидазной системе фагоцита и отсутствии оксидативного стресса (таблица 4.1.3),

хотя последний, согласно литературным данным, характерен для воздействия наноселена [80, 135].

Исходя из вышеизложенных результатов, можно предположить разноплановое действие НЧ и растворенной формы селена, проявившееся в виде цитотоксического действия НЧ, обусловленного их физическими свойствами, и протекторного эффекта селена как микроэлемента.

Согласно данным литературы, большинство изученных НЧ нерастворимы в воде и хорошо растворимы в биологических средах [198], что позволяет предположить неполное растворение НЧ SeO при попадании в дыхательные пути. За счет этих нерастворенных частиц могло произойти увеличение притока общей клеточности ввиду некоторой мобилизации АМ и НЛ, о чем свидетельствует незначимо возросшее отношение НЛ/АМ (таблица 4.1.1); именно эти частицы, отложенные в дыхательных путях, фагоцитировали АМ, о чем свидетельствует рост активности и индекса фагоцитоза (таблица 4.1.3).

При этом АМ еще не были повреждены поглощаемыми частицами и не были разрушены, о чем можно судить по биохимическим показателям надосадочной жидкости БАЛ, в которой содержание внутриклеточных ферментов статистически не отличается от соответствующих контрольных значений (таблица 4.1.2). Одним из ведущих механизмов повреждения клеток организма, в том числе опосредованным НЧ [153, 166], может являться перекисное окисление липидов (ПОЛ), сопровождающееся образованием свободных радикалов и развитием окислительного стресса. Поскольку из-за способности растворяться в биологических средах эффекты НЧ на организм зависят, в том числе от действия соответствующего химического элемента в ионо-молекулярной форме, полученное отсутствие повреждений может быть связано с воздействием растворившихся НЧ [103]. Кроме того, Chen и соавт. утверждают, что наночастицы селена сами по себе являются «движущей силой» токсичности, в то время как растворенные ионы оказывают лишь незначительный вклад [80].

Мы же предполагаем, исходя из данных литературы, что селен участвует в ингибировании ПОЛ, индуцированное нерастворившимися НЧ, на различных его

звеньях [6]. Отметим, что одним из главных антиоксидантных ферментов является селензависимая глутатионпероксидаза, основной функцией которой является защита биологических мембран и внутриклеточных органелл от окислительного повреждения [131].

При комбинированном действии НЧ SeO и НЧ CuO, отложившиеся в глубоких дыхательных путях, вызывают статистически значимое по сравнению с показателями контрольной группы увеличение притока общей клеточности и абсолютного числа НЛ. При этом статистически значимо по сравнению с контролем повышается отношение НЛ/АМ, важный цитологический показатель реакции глубоких дыхательных путей [17, 63, 161, 170]. Реакция на комбинированное действие НЧ SeO и НЧ CuO является более выраженной, нежели на какую-либо из этих частиц по цитологическим показателям БАЛЖ (см. Табл. 4.1.4) при изолированном воздействии, что свидетельствует о более высокой токсичности НЧ в комбинации.

Таблица 4.1.4 – Число клеток в жидкости, полученной при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксидов селена, меди либо их комбинации ( $X \pm Sx$ )

Цитологические показатели		Число клеток* $10^6$				НЛ/АМ
		общее	лимфоциты	НЛ	АМ	
Группы крыс	Контроль	3,62 ± 0,35	0,13 ± 0,03	0,68 ± 0,11	2,57 ± 0,19	0,26 ± 0,04
	НЧ SeO	5,35 ± 0,72 *	0,29 ± 0,07	1,30 ± 0,26	3,11 ± 0,10	0,53 ± 0,13
	НЧ CuO	5,29 ± 0,84	0,37 ± 0,10	2,03 ± 0,31*	3,01 ± 0,72	0,55 ± 0,09 *
	НЧ SeO + НЧ CuO	15,97 ± 3,88 *#@	0,81 ± 0,19 *#	10,24 ± 2,72 *#@	4,93 ± 1,23	2,16 ± 0,43 *#@
<i>Примечание:</i> Статистически значимое отличие * - от контрольной группы, # - от группы НЧ SeO, @ - от группы НЧ CuO ( $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента)						

Исходя из данных оптической микроскопии, предполагается потенцированный характер комбинированной токсичности для всех показателей

клеточного состава жидкости БАЛ. Подробнее предположительный механизм комбинированного действия нанooksида селена и меди описан в конце раздела 4.1.

Анализ изоболограмм, полученных с помощью построения поверхности отклика (RSM-анализ), подтвердил это предположение, выявив потенцированный характер комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO в 100% случаев по показателям клеточного состава жидкости БАЛ с переходом в аддитивность при больших дозах обоих веществ (рисунок 4.1.1).

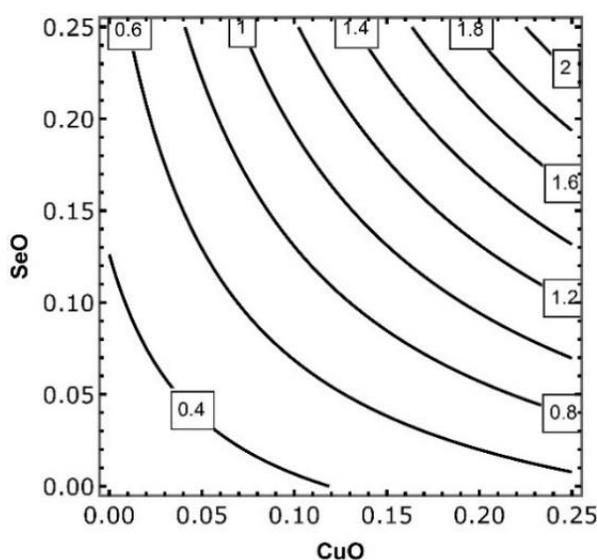


Рисунок 4.1.1 – Пример изоболограммы, иллюстрирующий характер типа комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO на клеточные показатели БАЛЖ, а именно отношение НЛ/АМ: потенцирование на низких дозах НЧ, переходящее в аддитивность на высоких. На осях дозы соответствующих НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта (отношение НЛ/АМ)

В таблице 4.1.5 приведены биохимические показатели надосадочной БАЛЖ крыс, подвергшихся острому воздействию НЧ изолированно либо в комбинации.

При комбинированном интратрахеальном введении НЧ SeO и НЧ CuO наблюдалось статистически значимое в сравнении с контролем увеличение активности практически всех изученных ферментов, за исключением ГТПП: АлАТ, амилаза, АсАТ, ЛДГ.

RSM-анализ выявил неоднозначность характера комбинированного токсического действия по рассматриваемым показателям. Противоположное действие низких доз токсикантов, переходящее в практически однофакторное действие меди и далее в аддитивное действие на высоких дозах обоих токсикантов через потенцирование наблюдалось для активности маркерных ферментов цитолиза АлАТ, АсАТ и ЛДГ. В качестве примера приведена изоболограмма, иллюстрирующая сложный тип комбинированного действия по показателю активности АсАТ (рисунок 4.1.2 А). Практически однофакторное действие НЧ SeO наблюдалось для воздействия на активность ГГТП (рисунок 4.1.2 Б). Потенцированный характер комбинированного действия, переходящий в аддитивность на высоких дозах обоих веществ, показан для воздействия на активность амилазы (рисунок 4.1.2 В).

Таблица 4.1.5 – Биохимические показатели надосадочной жидкости, полученной при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксидов селена, меди либо их комбинации ( $X \pm S_x$ )

Биохимические показатели		АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	Амилаза, Е/л	ГГТП, Е/л	ЛДГ, Е/л
Группы крыс	Контроль	1,98 ± 0,28	11,18 ± 1,51	2,63 ± 0,06	1,57 ± 0,36	34,29 ± 2,10
	НЧ SeO	1,83 ± 0,18	9,50 ± 1,46	3,24 ± 0,64	3,55 ± 1,52	25,56 ± 5,31
	НЧ CuO	2,73 ± 0,25*#	2,97 ± 0,48	15,25 ± 1,11*#	1,66 ± 0,20	46,38 ± 3,25*#
	НЧ SeO + НЧ CuO	3,01 ± 0,34*#	44,10 ± 17,05*#@	26,10 ± 5,07*#	3,55 ± 1,04	84,56 ± 20,88*#
<i>Примечание:</i> Статистически значимое отличие * - от контрольной группы, # - от группы НЧ SeO, @ - от группы НЧ CuO (p<0,05 по t-критерию Стьюдента)						

Выраженные изменения в группе комбинированного воздействия были получены из-за преимущественно аддитивного действия НЧ SeO и НЧ CuO (в 80% случаев по биохимическим показателям надосадочной жидкости БАЛ).

Недавние исследования показали, что контакт легочной ткани с НЧ размером около 50 нм способен приводить к перфорации мембран альвеолярных клеток I типа и последующему проникновению НЧ внутрь таких клеток. Это, в свою очередь, вызывает некроз клеток [169], сопровождающийся выбросом клеточных ферментов в цитоплазму, а затем во внеклеточную жидкость, произошедшего в результате повреждения фаголизосом макрофагов и эпителиальных клеток. Другой причиной биохимических сдвигов, помимо цитотоксического действия НЧ, могли стать острые воспалительные изменения в легочной ткани, индуцированные медью [96, 104, 156]. В пользу последнего свидетельствует рост абсолютного числа лимфоцитов в БАЛЖ (таблица 4.1.4).

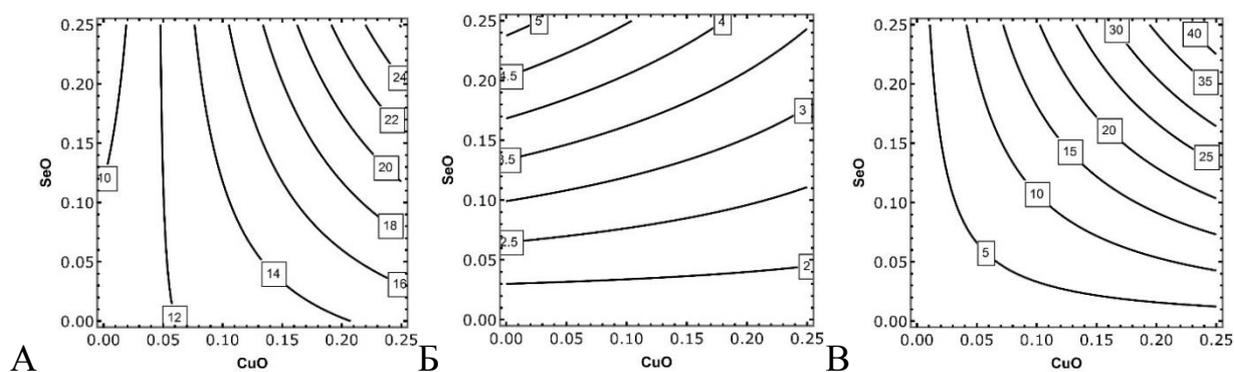


Рисунок 4.1.2. – Примеры изоболограмм, иллюстрирующих неоднозначность характера типа комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO на биохимические показатели надосадочной жидкости БАЛ: (а) активность АсАТ: однофакторное действие НЧ CuO на низких дозах меди, переходящее в аддитивное при высоких нозах НЧ SeO и НЧ CuO; (б) активность ГГТ: антагонизм НЧ SeO и НЧ CuO, переходящий в аддитивное при высоких нозах; (в) активность амилазы: потенцирование на низких дозах НЧ, переходящее в аддитивность на высоких. На осях дозы соответствующих ЭО-НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта (Е/л)

При комбинированном интратрахеальном введении НЧ SeO и НЧ CuO наблюдали резкое увеличение процента НЛ, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа и рост среднего числа частиц латекса, поглощенных одним НЛ.

Результаты НСТ-теста не отличались от контрольных значений, что свидетельствует об отсутствии изменений во внутриклеточной НАДФ-Н-оксидазной системе фагоцита (таблица 4.1.6). Исходя из полученных результатов, предполагается противонаправленное действие НЧ SeO и НЧ CuO на активность и индекс фагоцитоза АМ и аддитивное действие на активность и индекс фагоцитоза НЛ.

Таблица 4.1.6 – Показатели фагоцитоза НЛ и АМ, полученных при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам суспензии наночастиц оксидов селена, меди либо их комбинации ( $X \pm S_x$ )

Показатель		Активность фагоцитоза, процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа		Индекс фагоцитоза, среднее число частиц латекса, поглощенных одной клеткой		НСТ-тест, % восстановленных фагоцитом гранул растворимого красителя НСТ в нерастворимый диформазан
		АМ	НЛ	АМ	НЛ	
Группы крыс	Контроль	10,60 ± 0,60	9,40 ± 0,40	1,190 ± 0,077	1,060 ± 0,024	1,43 ± 0,20
	НЧ SeO	20,63 ± 2,73 *	13,80 ± 2,15	2,04 ± 0,30 *	1,50 ± 0,25	1,50 ± 0,19
	НЧ CuO	11,67 ± 1,03 #	10,40 ± 0,51	1,11 ± 0,04 #	1,10 ± 0,00	2,67 ± 0,65
	НЧ SeO + НЧ CuO	11,60 ± 1,44 #	21,20 ± 0,49 *#@	1,24 ± 0,09	2,08 ± 0,06 *@	3,00 ± 0,67

*Примечание:*

Статистически значимое отличие \* - от контрольной группы, # - от группы НЧ SeO, @ - от группы НЧ CuO ( $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента)

По результатам RSM-анализа комбинированное действие НЧ SeO и НЧ CuO на активность и интенсивность фагоцитоза АМ действительно является противонаправленным, но только на высокой дозе НЧ SeO при низкой дозе НЧ CuO. С увеличением дозы НЧ CuO характер комбинированного действия меняется. В качестве примера приведена изоболограмма, иллюстрирующая комбинированное воздействие по показателю активность фагоцитоза АМ (рисунок

3.1.3 А). Комбинированное действие НЧ SeO и НЧ CuO на активность и интенсивность фагоцитоза НЛ действительно является аддитивным на высоких дозах обоих токсикантов и потенцированием на низких. В качестве примера приведена изоболограмма, иллюстрирующая неоднозначность типа комбинированного действия по показателю активность фагоцитоза НЛ (рисунок 4.1.3 Б). В то же время, на результаты НСТ-теста при комбинированном воздействии изученных НЧ в изученных дозах, влияние оказали только НЧ CuO (рисунок 4.1.3 В).

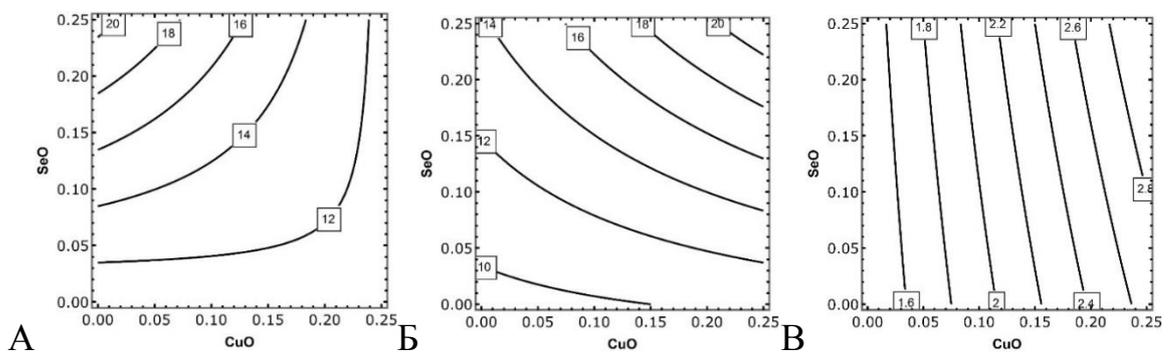


Рисунок 4.1.3 – Примеры изоболограмм, иллюстрирующих неоднозначность характера типа комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO на: (а) активность фагоцитоза AM: преимущественно однофакторное действие НЧ SeO при низких дозах НЧ SeO и НЧ CuO, антагонизм при высоких дозах НЧ SeO и низких дозах НЧ CuO, преимущественно однофакторное действие НЧ CuO при высоких дозах НЧ CuO; (б) активность фагоцитоза НЛ: аддитивность (в) результаты НСТ-теста: однофакторное действие НЧ CuO. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта

Поскольку типологическая оценка каждой изученной комбинации должна быть более или менее однозначна, при оценке комбинированного действия принимается превалирующее значение комбинированного действия того соотношения доз, в котором рассматриваемая комбинация встречается в реальных условиях [29, 34]: исходя из результатов контроля условий труда рабочих медеплавильного предприятия, это низкие дозы НЧ SeO и НЧ CuO. Для

цитотоксического комбинированного действия на указанных дозах характерно потенцирование в 43% случаев. Отметим, что наиболее важным показателем оценки реакции альвеолярного фагоцитоза является соотношение НЛ/АМ, тип комбинированного действия которого на указанных дозах также может быть охарактеризован как потенцирование.

Цитотоксическое действие при комбинированном воздействии НЧ SeO и НЧ CuO представляется следующим образом (рис. 4.1.4).

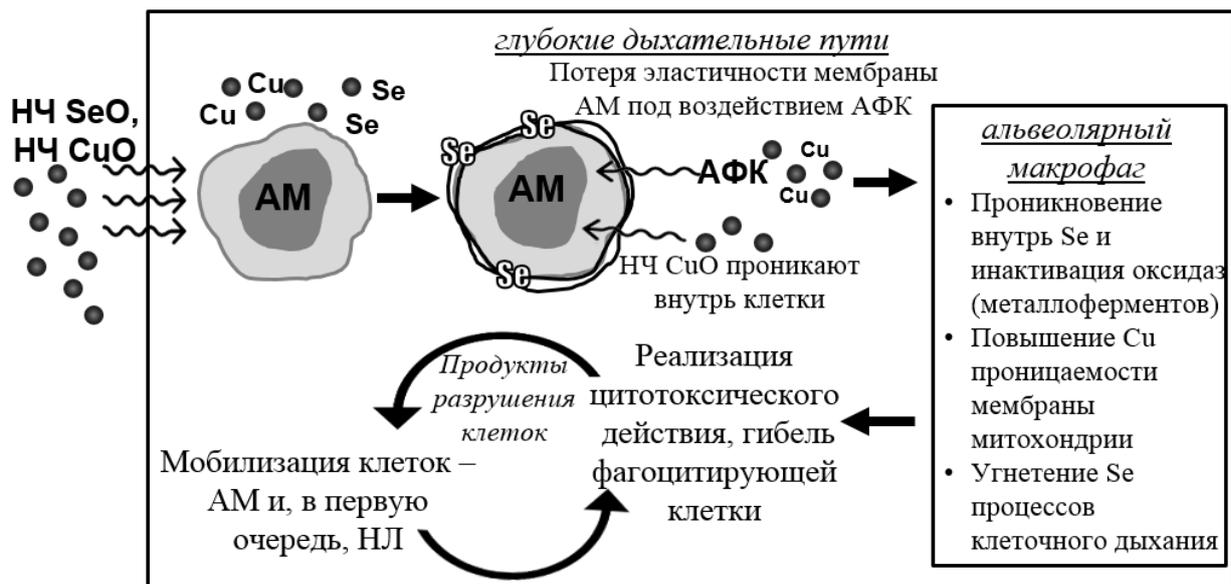


Рисунок 4.1.4 – Предполагаемый механизм комбинированного цитотоксического действия наночастиц оксидов селена и меди при остром интратрахеальном поступлении

Как известно из литературы, селен является эссенциальным микроэлементом и, особенно важно, компонентом глутатионпероксидаз, от которых сильно зависит целостность клеточных и внутриклеточных мембран [131, 182] и выступает в качестве протектора от цитотоксического действия токсикантов. Медь является важным кофактором ряда биологических процессов, включая митохондриальное окислительное фосфорилирование, детоксикацию свободных радикалов [124]. Избыток свободных ионов меди приводит к каскаду окислительно-восстановительных реакций, ведущих к образованию АФК. Образованию АФК способствуют и НЧ меди [167], но этим механизмы цитотоксического действия

наномеди не ограничиваются: Cuillel M. и соавт. (2014) в экспериментах на гепатоцитах линии HepG2 показали, что НЧ проникают внутрь (вероятнее всего, путем эндоцитоза), обходя клеточные механизмы защиты от избыточной меди. Взаимодействие НЧ и клетки приводит к высвобождению свободных радикалов [109]. Дополнительно индуцированное перекисным окислением липидов мембран образование АФК под воздействием НЧ может приводить к потере эластичности мембран, что, как и аномально высокая текучесть, неизбежно приводит к гибели клеток [92]. Вероятно, с этим же механизмом связано проникновением селена внутрь клетки после воздействия меди на мембрану (которое приводит к нарушению ее эластичности, целостности и позволяет наноселену проникнуть внутрь клетки). Механизм токсичности селена тоже связан с образованием АФК, а кроме – с инактивацией внутриклеточных металлсодержащих ферментов, в первую очередь оксидаз - цитохромоксидазы, каталазы, пероксидазы [44]. При попадании внутрь клетки медь повышает проницаемость мембраны митохондрии, а селен способен угнетать процессы тканевого дыхания [31].

## 4.2 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди в условиях эксперимента *in vitro* на биоэнергетические процессы в организме

При воздействии НЧ SeO на фибробластоподобные клетки *in vitro* снизилась интенсивность АТФ-зависимой люминесценции и скорость потребления кислорода клетками на исследованных концентрациях НЧ SeO в инкубационной среде (табл. 4.2.1.).

Экспериментальные данные о связи между снижением АТФ-зависимой люминесценции и дозой SeO-НЧ в культуре фибробластоподобных клеток имеют монотонный характер, хотя и с наличием заметного плато в середине диапазона (рис. 4.2.1).

Таблица 4.2.1. – Показатели, характеризующие цитотоксические эффекты на клетках, полученные в клеточных тестах *in vitro* при однократном внесении НЧ SeO в инкубационную среду ( $X \pm S_x$ )

Показатель	Концентрация НЧ SeO в инкубационной среде, мкг/мл			
	0 (Контроль)	25	50	100
АТФ-зависимая люминесценция, RLU	3,70 ± 0,36	2,543 ± 0,066 *	2,56 ± 0,13 *	0,89 ± 0,10 *#@
Скорость потребления кислорода клетками, E	57,60 ± 0,61	14,89 ± 2,08 *	13,50 ± 0,41 *	11,60 ± 0,31 *@
Примечание: Статистически значимое отличие * - от контрольной группы, # - от группы «НЧ SeO 25 мкг/мл», @ - от группы «НЧ SeO 50 мкг/мл» (p<0,05 по t-критерию Стьюдента)				

При концентрации 25 и 50 мкг/мл в инкубационной среде интенсивность цитотоксического действия, исходя из наличия плато в середине диапазона, одинакова – что может быть объяснено компенсацией за счет протекторного эффекта селена как эссенциального элемента неблагоприятного воздействия, присущего его наночастицам [216].

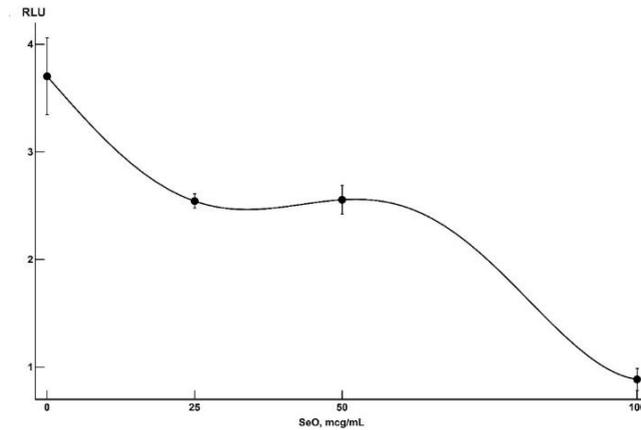


Рисунок 4.2.1 – Снижение АТФ-зависимой люминесценции в культуре клеток при воздействии различных доз SeO-НЧ. По оси абсцисс отложены действующие концентрации наночастиц в инкубационной среде, мкг/мл; по оси ординат отложены значения RLU. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего. Уравнение аппроксимирующей кривой:

$$y = 3.703 - 2.119 \sin(0.025x) - 0.2 \sin(0.035x) + 0.781 \sin(0.045x) + 0.822 \sin(0.055x) - 1.279 \sin(0.065x)$$

Анализ зависимости скорости потребления кислорода от дозы НЧ SeO показал, что она носит монотонный характер, поскольку эти НЧ вызвали резкое снижение скорости потребления кислорода клетками уже при минимальной из испытанных доз (25 мкг/мл), с выходом на плато при дозе 50 мкг/мл (рис.4.2.2). Полученный монотонный тип зависимости со снижением жизнеспособности клеток был неоднократно продемонстрирован в экспериментах на разных типах клеточных линий: например, MCF-7 (раковые клетки молочной железы) и HT-1080 (клетки фибросаркомы человека) с использованием селенсодержащих наночастиц, биологически синтезированных изолированным штаммом бактерий *Bacillus spp.* MSh-1 [164] и A549 (клеточной линии рака лёгкого) при воздействии селенсодержащих наночастиц, полученных из семян *Mucuna pruriens* [89].

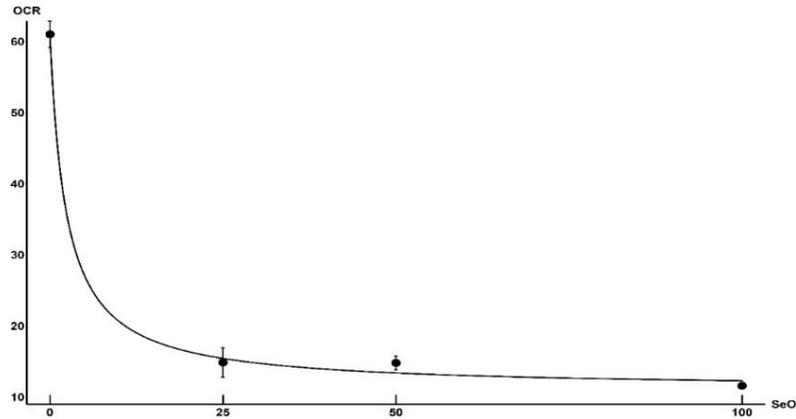


Рисунок 4.2.2 – Снижение скорости потребления кислорода в культуре клеток при воздействии различных доз НЧ SeO. По оси абсцисс отложены действующие концентрации наночастиц в инкубационной среде, мкг/мл; по ординате отложены значения OCR, pmol O<sub>2</sub>/min. Точки указывают средние значения со стандартной ошибкой среднего. Уравнение аппроксимирующей

$$\text{кривой: } y = \frac{4.83x + 61.80}{0.43x + 1.013}$$

Анализ комбинированной токсичности выявил аддитивность эффектов при всех изученных нами уровнях доз (рисунок 4.2.3) по показателю скорости потребления кислорода клетками, E.

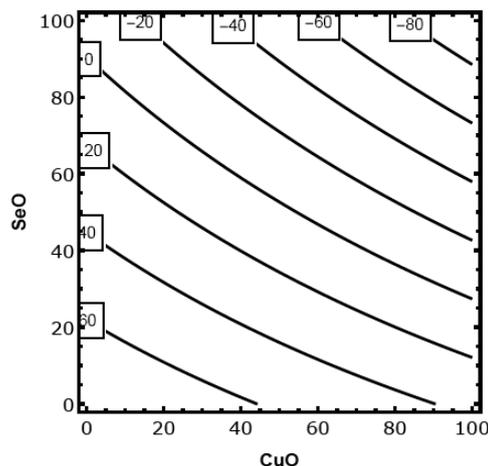


Рисунок 4.2.3 – Аддитивный тип комбинированного действия наночастиц SeO и CuO на скорость потребления кислорода клетками. На осях дозы соответствующих ЭО-НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта, E

### 4.3 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди в условиях субхронического воздействия *in vivo* на биоэнергетические процессы в организме

Изменение параметров, прямо или косвенно выявляющих нарушение функции митохондрии (снижение жизнеспособности и энергетического потенциала клеток, обнаруженные в исследованиях *in vitro*, см. раздел 4.2), было установлено и в эксперименте *in vivo*.

В ответ на субхроническое воздействие SeO НЧ в рамках метаболомного исследования крови данных с использованием метода главных компонент была показана кластеризация проб при анализе «до-после» воздействия. Это свидетельствует о наличии в составе крови экспериментальных животных существенных изменений (рис. 4.3.1). Пробы от животных контрольной группы образовали один кластер, за исключением единственного животного, по-видимому, имевшего некоторые отклонения в составе крови.

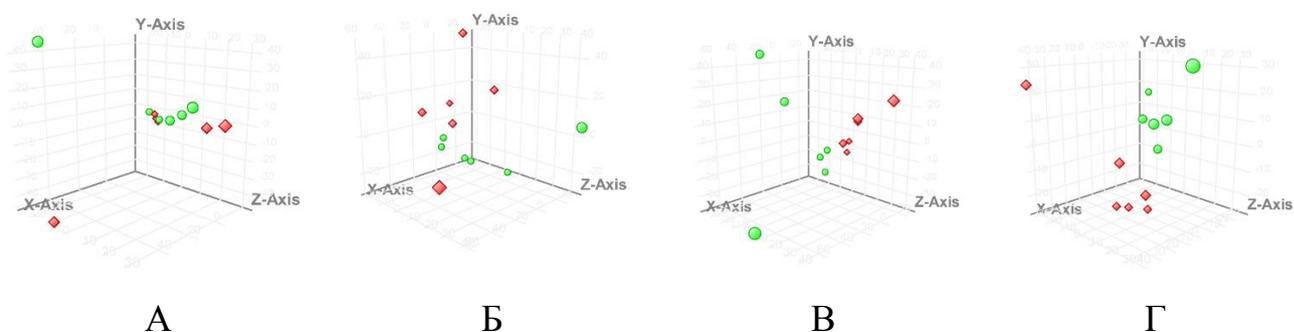


Рисунок 4.3.1 – Результаты анализа данных ВЭЖХ-МС спектров

проб крови методом главных компонент (● – до, ◆ - после воздействия):

А – контрольная группа, Б – группа «НЧ SeO 0,1», В – группа «НЧ SeO 0,5»,

Г – группа «НЧ SeO 1»

Только часть из выбранных веществ имела достаточную интенсивность аналитического сигнала для получения информативных фрагментных спектров, поэтому аннотацию удалось осуществить не для всех метаболитов в группах. Те,

что удалось идентифицировать, принадлежали к классам липидов и фосфолипидов (Таблица 4.3.1). Содержание ацилкарнитинов и их производных (деcanoилкарнитин, гидроксидеценоилкарнитин, гидроксигексадеcanoилкарнитин, тетрадекадиеноилкарнитин, см. табл.4.3.1, № 3-6) увеличивается во всех опытных группах, о чем свидетельствует возросшая в сравнении с контрольными значениями интенсивность аналитического сигнала. Эти метаболиты, с одной стороны, переносят жирные кислоты через карнитиновый челнок во внутренних мембранах митохондрий для дальнейшего бета-окисления, с другой – транспортируют излишки продуктов данного процесса из митохондрий и далее во внеклеточное пространство, поскольку избыток оксиацил-КоА-производных нарушает функции митохондрий вплоть до инициации апоптоза [70, 77, 192, 217]. Вариации в содержании указанных веществ свидетельствуют об изменениях в процессе бета-окисления жирных кислот, происходящего в митохондриях, что было показано ранее для воздействия солевых форм селена [177] и впервые показано для его воздействия в форме НЧ. Предполагаемое повреждение митохондрий, опосредованное нарушением их функции, было подтверждено методом электронной микроскопии: при ультраструктурном исследовании отмечено снижение процентного соотношения нормальных митохондрий (типа А и В по Mei G. Sun и соавт.(2007) [86],  $87,44 \pm 1,14\%$  в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с  $94,82 \pm 0,95\%$  в группе «Контроль»,  $p < 0,05$ ) в тканях печени. Патологические изменения в митохондриях, «энергетических станциях» клетки, обнаруженные методом метаболомного анализа и визуализированные с помощью метода электронной микроскопии, привели к снижению их энергетического потенциала. О последнем косвенно судили по статистически значимому, монотонному и дозозависимому снижению активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови под воздействием НЧ SeO (рис. 4.3.2), которая является зеркалом энергетических процессов в организме [57, 209]. Снижение активности СДГ, вероятно, связано с известной из литературы способностью селена замещать серу в соединениях [210].

Таблица 4.3.1 – Результаты метаболомного скрининга крови крыс, подвергнутых субхроническому воздействию НЧ SeO

№	Вещество	Группы и изменение содержания метаболитов «до-после»					
		НЧ SeO 0,1	р- значение	НЧ SeO 0,5	р- значение	НЧ SeO 1	р- значение
1	Желчная кислота	-		↓	0,0292	-	
2	Гликохолевая кислота	-		↓	<0,001	-	
3	Деканоилкарнитин	-		↓	0,00773	-	
4	Гидроксидеценоилкарнитин	-		↓	<0,001	↓	0,00570
5	Гидроксигексадеканоилкарнитин	↓	0,0413	↓	0,00505	↓	0,0483
6	Тетрадекадиеноилкарнитин	-		↑	<0,001	↑	0,00665
7	Тетракозагексаеновая кислота	-		↓	0,0430	-	
8	Метил арахидонат	-		↑	0,00310	↑	0,00119
9	Метил гексадекановая кислота	-		↑	0,00354	↑	<0,001
10	Метил линолеат	↑	<0,001	↑	<0,001	↑	<0,001
11	Метил-(10)-джинджерол	↑	0,00350	↑	0,00212	-	
12	13'-Гидрокси-альфа-токоферол	↑	0,0262	-		↑	0,0203
13	Фосфорилхолин	↑	0,00765	-		↑	0,00570
14	PC(16:1/2:0)	-		-		↓	0,0288
15	PC(3:0/2:0)	-		↑	<0,001	-	
16	LPC(9:0)	↓	0,00765	-		-	
17	LPC(18:2)	↑	0,00756	-		-	
18	LPC(18:3)	-		↑	0,00774	-	
19	LPC(20:4)	↑	0,00742	↑	0,0462	-	
20	LPC(28:6)	-		↓	0,00633	-	
21	2-(9-Оксононаноил)-глицеро-3-фосфохолин	-		-		↓	0,00570
22	LPE(18:2)	-		↑	0,0445	-	
23	PS(3:0/2:0)	-		↑	0,0462	-	
24	LPI(18:0)	-		-		↑	0,0402
25	LPI(20:4)	↑	<0,001	-		-	

Примечание:

PC – фосфатидилхолин, LPC – лизофосфатидилхолин, LPE – лизофосфатидилэтанолламин, PS – фосфатидилсерин, LPI – лизофосфатидилинозитол. Символом «↑» обозначается повышение интенсивности аналитического сигнала массы метаболита при сравнении до-после эксперимента, символом «↓» - снижение, «-» - для данного вещества не выявлено значимого изменения содержания в данной группе.

При комбинированном воздействии НЧ SeO и НЧ CuO на разных уровнях доз также наблюдалось снижение уровня СДГ в лимфоцитах крови (рис. 4.3.2).

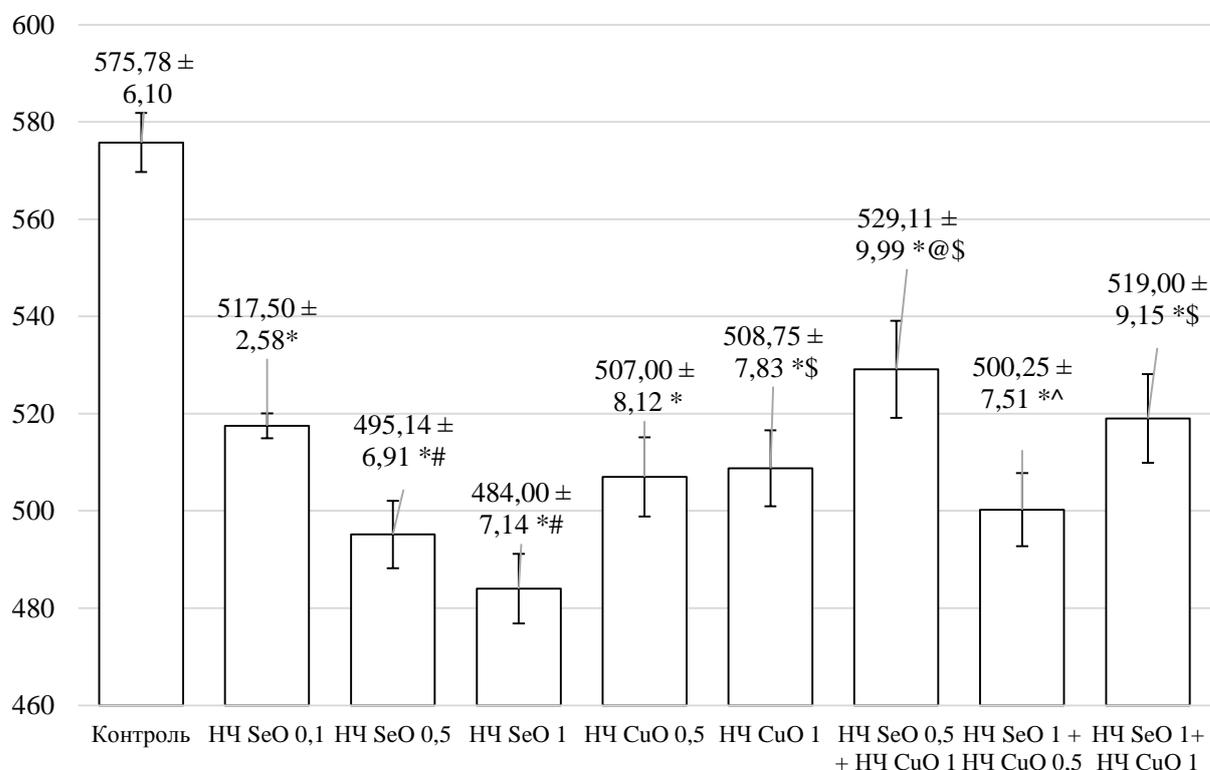


Рисунок 4.3.2 – Изменение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови: по оси абсцисс указаны группы животных; по ординате отложены значения активности СДГ (число гранул формазана в 50 лимфоцитах). Примечание: значком «\*» отмечены значения, имеющие статистически значимые отличия от контрольной группы, «#» - от группы «НЧ SeO 0,1», @ - от группы «НЧ SeO 0,5», \$ - от группы «НЧ SeO 1», ^ - от группы «НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 1» (по t-критерию Стьюдента при  $p \leq 0,05$ )

При анализе изоболограмм, полученных с помощью построения поверхности отклика (RSM-анализ), тип комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO внутри диапазона изученных доз был неоднозначен: от аддитивности на низких дозах через антагонизм при высоких дозах одного токсиканта и низких другого до потенцирования при сочетании высоких доз (см. рис. 4.3.3.).

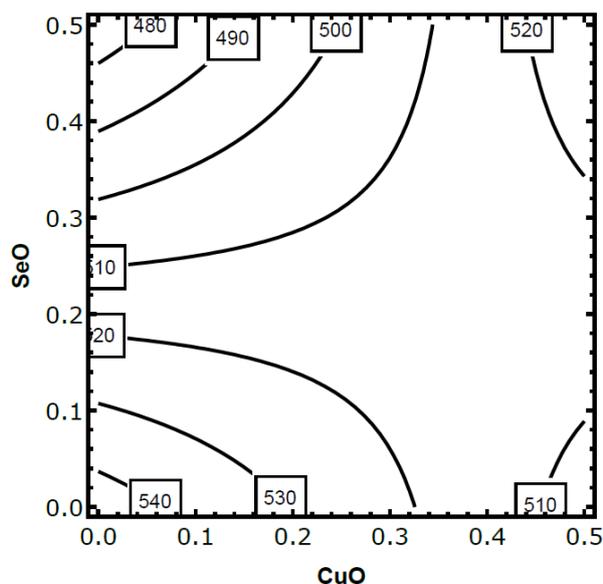


Рисунок 4.3.3 – Неоднозначность комбинированного субхронического действия наночастиц SeO и CuO на активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах крови: аддитивность на низких дозах через антагонизм при высоких дозах одного токсиканта и низких другого переходит в потенцирование при сочетании высоких доз. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта (количество гранул формазана в 50 лимфоцитах)

#### **4.4 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние печени**

Высокая способность НЧ транспортироваться по кровяному руслу и проникать внутрь клеток различных органов [218] в сочетании с фундаментальной ролью сукцинатдегидрогеназы в цепи переноса электронов митохондрий обуславливает изменение функций жизненно важных органов и систем. В первую очередь страдает печень, что логично вытекает из ее барьерной функции. Токсическое действие наночастиц зависит от их химической природы [198], а печень является основным органом-депо [202] и органом-мишенью для токсического действия селена [128].

При гистоморфологической оценке тканевых препаратов было установлено резкое увеличение числа безъядерных гепатоцитов ( $27,60 \pm 1,46$  клеток в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с  $8,90 \pm 0,56$  в контроле,  $p < 0,05$ ) и купферовских клеток ( $20,50 \pm 0,71$  клеток в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с  $11,50 \pm 0,58$  в контроле,  $p < 0,05$ ).

При цитологическом исследовании мазков-отпечатков печени увеличилось соотношение дегенеративно-измененных гепатоцитов (см. таблицу 4.4.1).

Активность АлАТ в сыворотке крови статистически значимо в сравнении с контролем увеличилась в группе «НЧ SeO 0,1». Во всех группах, экспонированных к наночастицами селена, дозозависимо снизилась концентрация ЩФ в сыворотке крови, но только в группе «НЧ SeO 1» статистически достоверно по сравнению с контролем (табл.4.4.1).

В совокупности с тенденцией к повышению активности АлАТ, снижению ЩФ и дегенеративными изменениями гепатоцитов, уменьшение содержания желчной и гликохолевой кислот (табл. 4.3.1, №1,2) в группе, экспонированной к НЧ SeO, может указывать на повреждение и нарушение секреторных функций печени под действием НЧ SeO [177; 116]. С последним согласуется снижение интенсивности аналитического сигнала лизофосфатидилхолинов LPC (9:0) и LPC (28:6) (табл.4.3.1, №16,20), включающих в своем составе короткие и очень длинные жирные кислоты, поскольку данные вещества синтезируются преимущественно в печени и участвуют в транспорте жирных кислот, а также являются прекурсорами мембранных фосфолипидов [197]. С другой стороны, повышение содержания лизофосфатидилхолинов LPC (18:2), LPC (18:3) и LPC (20:4) (табл.4.3.1, №17-19) может говорить об интенсификации воспалительных процессов в организме животных [133]. Как переносчики линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот, упомянутые вещества выступают в качестве прекурсоров эйкозаноидов – медиаторов воспаления, и могут синтезироваться непосредственно из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипазы А [65]. Кроме того, полученные результаты согласуются с литературными данными о возможности селена [108] и селенсодержащих НЧ [207] влиять на синтез липидов.

В пользу угнетения секреторных функций печени под воздействием НЧ SeO свидетельствует и накопление в крови эфиров жирных кислот, расщепляемых печеночными фосфолипазами в составе липопротеидов очень низкой плотности, с одновременным уменьшением содержания тетракозагексаеновой кислоты, что может происходить при замещении серы селеном в белках-липазах с соответствующим снижением их активности [210].

Таблица 4.4.1 – Показатели состояния печени крыс, подвергшихся субхроническому воздействию наночастиц оксида селена

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,1	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках печени крыс, %				
Дегенеративно-измененные гепатоциты	5,33 ± 0,42	4,33 ± 0,33	12,33 ± 0,76 *♦	11,00 ± 0,73 *♦
Нейтрофилы	8,67 ± 0,33	6,50 ± 0,43 *	6,50 ± 0,76 *	5,67 ± 0,67 *
Эозинофилы	3,67 ± 0,42	3,33 ± 0,49	4,17 ± 0,48	4,00 ± 0,516
Двухядерные клетки	1,50 ± 0,224	1,50 ± 0,224	1,33 ± 0,211	1,17 ± 0,17
Купферовские макрофаги	3,83 ± 0,31	3,50 ± 0,43	2,50 ± 0,43 *	3,83 ± 0,31 ●
Биохимические показатели сыворотки крови				
Аланинаминотрансфераза в сыворотке крови, Е/л	42,96 ± 2,55	56,64 ± 3,47 *	56,44 ± 4,95	46,58 ± 3,76
Щелочная фосфатаза в сыворотке крови, Е/л	199,28 ± 9,45	189,87 ± 15,45	175,05 ± 10,08	127,76 ± 12,37 *♦●
<i>Примечание:</i> Статистически значимое отличие * - от контрольной группы; ♦ - от групп «НЧ SeO 0,1»; ● - от группы «НЧ SeO 0,5» (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).				

В дополнение к изложенному, известно, что лизофосфатидилэтаноламины (LPE) способны подавлять синтез фосфолипаз в печени – по неуточненному механизму [134]. Повышение содержания LPE (18:2) в группе «НЧ SeO 0,5»

хорошо согласуется с наибольшим количеством эфиров жирных кислот, присутствующих в крови животных данной группы.

Статистически значимое увеличение содержания лизофосфатидилинозитолов, по большей части синтезируемых в печени (80 % от общего пула) [91] было обнаружено в группах «НЧ SeO 0,1» и «НЧ SeO 1» (табл.4.3.1, №24,25). В «НЧ SeO 0,5» подобного эффекта не выявлено, вероятно, по причине наибольшего угнетения функций печени в данной группе, описанного выше в связи с изменениями содержания желчной кислоты и эфиров жирных кислот. Лизофосфатидилинозитолы выступают как прекурсоры для синтеза фосфатидилинозитолди – и трифосфатов – модификаторов клеточной мембраны, изменяющих ее текучесть, и, таким образом, способствующих изменению активности мембранных каналов [160]. Также известно, что процессы модификации фосфолипидных мембран связаны с обогащением последних производными LPI [159].

С другой стороны, данные вещества являются лигандами для GPR55 [67] – рецептора, сопряженного с G-белком, опосредующим внутриклеточные сигнальные каскады, и стимулирующим: экзоцитоз - секреция инсулина, нейромедиаторов; выработку про- и противовоспалительных интерлейкинов, фосфолипаз – синтез про- и противовоспалительных эйкозаноидов; пролиферацию, миграцию клеток; ангиогенез, показанный на опухолевых тканях при искусственном привнесении LPI [76, 147, 159, 204]. Изменение содержания лизофосфатидилинозитолов в работах по изучению метаболомного отклика организма на действие соединений селена, в том числе в солевой форме, ранее выявлено не было.

Таблица 4.4.2 – Показатели состояния организма крыс, подвергнутых субхроническому воздействию разных доз НЧ SeO и / или НЧ CuO ( $x \pm Sx$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1	НЧ CuO 0,5	НЧ CuO 1	НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 1	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5	НЧ SeO 1+ НЧ CuO 1
	*	2	3	4	5	6	7	8
Аланинаминотрансфераза в сыворотке крови, Е/л	42,96 ± 2,55	56,44 ± 4,95	46,58 ± 3,76	50,37 ± 2,04 *	47,05 ± 3,48	47,87 ± 3,42	47,44 ± 3,03	53,46 ± 2,71 *
Альбумины в сыворотке крови, г/л	43,35 ± 1,64	43,67 ± 1,60	42,40 ± 1,29	43,17 ± 1,18	40,63 ± 0,97	40,30 ± 0,71	44,04 ± 0,90 578	40,07 ± 1,28
Глобулины в сыворотке крови, г/л	15,33 ± 4,36	19,13 ± 3,40	10,61 ± 3,57	14,31 ± 3,67	17,75 ± 4,28	20,59 ± 6,22	16,43 ± 3,53	18,53 ± 4,01
А/Г индекс	1,904 ± 0,082	1,75 ± 0,12	1,981 ± 0,091	1,775 ± 0,088 <sup>4</sup>	1,468 ± 0,065 <sup>*3</sup>	1,538 ± 0,052 <sup>*35</sup>	1,750 ± 0,030 <sup>468</sup>	1,452 ± 0,060 <sup>*35</sup>
Щелочная фосфатаза в сыворотке крови, Е/л	199,28 ± 9,45	175,05 ± 10,08	127,76 ± 12,37 <sup>*2</sup>	194,77 ± 19,35 <sup>34</sup>	136,47 ± 13,96 <sup>*2</sup>	155,61 ± 15,04	144,16 ± 4,39 <sup>*25</sup>	174,76 ± 19,84
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках печени крыс, %								
Дегенеративно-измененные гепатоциты	5,33 ± 0,42	12,33 ± 0,76 *	11,00 ± 0,73 *	8,33 ± 0,67 <sup>*234</sup>	11,00 ± 0,632 *	7,67 ± 0,56 <sup>*234</sup>	12,50 ± 0,62 <sup>*56</sup>	10,83 ± 1,11 *
Нейтрофилы	8,67 ± 0,33	6,50 ± 0,76 *	5,67 ± 0,67 *	4,83 ± 0,31 *	5,50 ± 0,62 *	4,17 ± 0,48 <sup>*2</sup>	6,00 ± 0,5774 <sup>*6</sup>	5,00 ± 0,5774 *
<i>Примечания.</i>								
Значком * показаны отличия от контрольной группы, числовыми обозначениями - от соответствующей опытной группы (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).								

При комбинированной интоксикации НЧ SeO и НЧ CuO наблюдалось снижение белково-образовательной функции печени, о котором судили по снижению альбумино-глобулинового индекса и снижению активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Как видно из Таблицы 4.2.2, при дозе селена, превышающей дозу меди «НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5» значение показателя приближается к контрольному. Вероятно, ведущий вклад в снижение альбумино-глобулинового индекса вносят НЧ CuO.

Статистически значимое снижение активности ЩФ в сыворотке крови (таблица 4.4.2), равно как и повышение числа дегенеративно-измененных гепатоцитов в мазках-отпечатках печени (Таблица 4.4.2), соотношения безъядерных гепатоцитов (рисунок 4.4.1 А) и количества купферовских клеток (рисунок 4.4.1 Б) происходит при изолированном влиянии обоих токсикантов. Такое изменение показателей может свидетельствовать о неоднозначности их комбинированного действия.

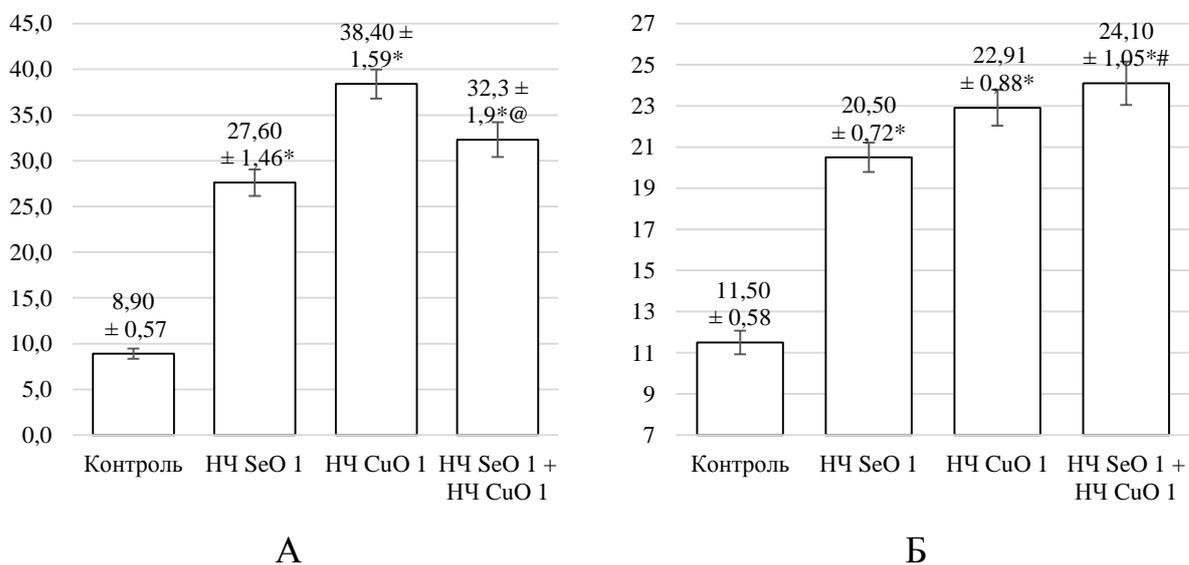


Рисунок 4.4.1 – Изменения (А) соотношения безъядерных гепатоцитов, %; (Б) количества купферовских клеток: по оси абсцисс указаны группы животных; по ординате отложены значения. Примечание: значком «\*» отмечены значения, имеющие статистически значимые отличия от контрольной группы, «#» - от группы «НЧ SeO», «@» - от группы «НЧ CuO 0,5» (по t-критерию Стьюдента при  $p \leq 0,05$ )

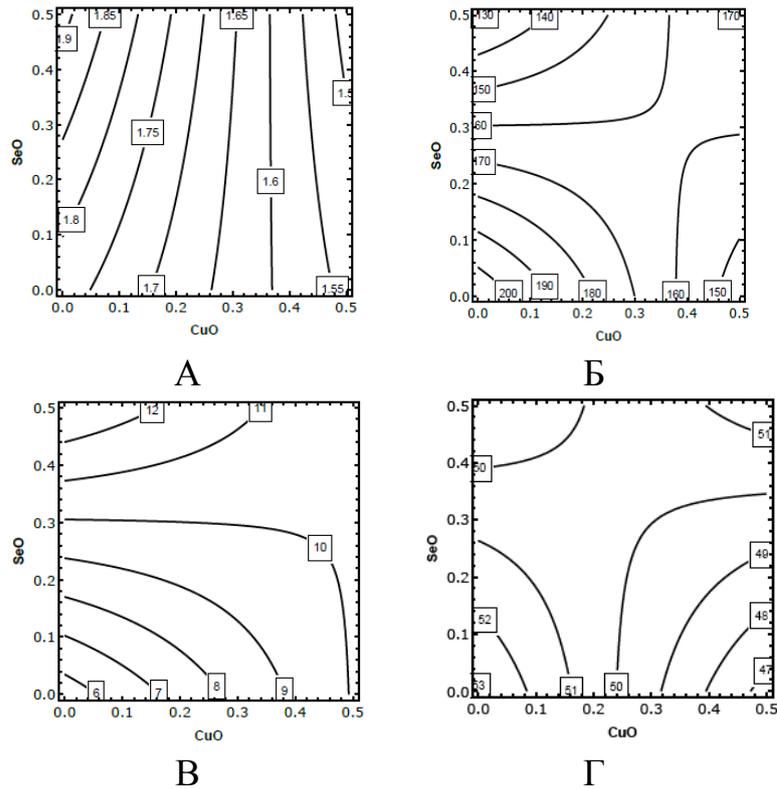


Рисунок 4.4.2– Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированного действия селена и меди на различные показатели состояния печени: (А) изменение альбумино-глобулинового индекса: преимущественно однофакторное действие НЧ CuO; (Б) изменение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови: от аддитивности на низких дозах НЧ до явного антагонизма при сочетании низких доз одних НЧ и высоких доз других НЧ; (В) число дегенеративно-измененных гепатоцитов в мазках-отпечатках печени: от аддитивности на низких дозах НЧ до явного антагонизма при сочетании низких доз НЧ CuO и высоких доз НЧ SeO и преимущественно однофакторного действия НЧ CuO при сочетании высоких доз НЧ CuO с низкими дозами НЧ SeO; (Г) изменение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови: от аддитивности на низких дозах НЧ через явный антагонизм при сочетании низких доз одних НЧ и высоких доз других НЧ до небольшого потенцирования при сочетании высоких доз НЧ. На осях дозы соответствующих ЭО-НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта

Наше предположение о преимущественно однофакторном действии НЧ CuO на снижение альбумино-глобулинового индекса (рис. 4.4.2 А) и о неоднозначности действия на активность ЩФ в сыворотке крови (рис.4.4.2 Б), на число дегенеративно-измененных гепатоцитов в мазках-отпечатках печени (рис. 4.4.2 В), на изменение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови (рис. 4.4.2 Г) подтверждается RSM-анализом. При этом на рис. 4.4.2 Б-Г наблюдаются изменения типа комбинированного действия от аддитивности на низких дозах токсикантов до явного антагонизма при сочетании низких доз одних НЧ и высоких доз других НЧ, а кое-где и до потенцирования на высоких дозах НЧ. Последнее свидетельствует о возможности НЧ SeO оказывать некоторые защитные эффекты на фоне воздействиях низких доз НЧ CuO.

#### **4.5 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние почек**

Интенсивное кровоснабжение и участие почек в выведении токсикантов создают условия для продолжительного их контакта с почечными структурами.

Выявлена тенденция колебания уровня белка в крови по типу гормезиса: при увеличении дозы наблюдается снижение в сравнении с контролем, затем повышение и вновь снижение. Так же, как и в крови, отмечается тенденция дозовозависимого колебания уровня белка в моче по типу гормезиса, однако она имеет противоположную направленность (таблица 4.5.1). В группе «НЧ SeO 0,5» в сравнении с контролем снизился уровень креатинина в сыворотке крови, и, хотя статистически не значимо, но повысился в моче (таблица 4.5.1). При цитологической оценке мазков-отпечатков почек показана способность НЧ SeO оказывать нефротоксическое действие (таблица 4.5.1).

Таблица 4.5.1 – Показатели состояния почек крыс, подвергшихся субхроническому воздействию наночастиц оксида селена

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,01	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках почек крыс, %				
Дегенеративные клетки проксимальных канальцев	6,33 ± 0,49	6,83 ± 0,79	16,33 ± 0,92 *♦	17,33 ± 0,99 *♦
Дегенеративные клетки дистальных канальцев	5,00 ± 0,5774	5,67 ± 0,56	7,00 ± 0,37 *	6,83 ± 0,48 *
Эозинофилы	2,67 ± 0,33	3,00 ± 0,37	4,50 ± 0,43 *♦	4,33 ± 0,49 *
Биохимические показатели сыворотки крови и мочи				
Общий белок в сыворотке крови, г/л	68,90 ± 1,60	65,60 ± 1,42	69,18 ± 0,88 ♦	64,40 ± 2,12 •
Креатинин в сыворотке, мкмоль/л	39,18 ± 1,63	35,64 ± 0,99	37,63 ± 1,15	33,13 ± 1,35 *•
Креатинин в моче, ммоль/л	1,64 ± 0,15	1,61 ± 0,28	1,71 ± 0,22	2,78 ± 0,99
Белок в моче, мг/л	232,16 ± 16,08	268,28 ± 54,75	194,17 ± 28,60	377,35 ± 147,54
<i>Примечание:</i> Статистически значимое отличие * - от контрольной группы; ♦ - от групп «НЧ SeO 0,1»; • - от группы «НЧ SeO 0,5» (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).				

В группах «НЧ SeO 0,5» и «НЧ SeO 1» изменения цитологических характеристик мазков-отпечатков почек были приблизительно одинаковой степени выраженности и включали в себя, кроме увеличения доли эозинофилов, резко увеличенное число дегенеративных клеток проксимальных и дистальных канальцев почек (таблица 4.5.1). При гистоморфометрической оценке отмечается выраженная потеря щеточной каемки канальцевого эпителия почки ( $17,39 \pm 1,64$  клеток в группе «НЧ SeO 1» в сравнении с  $5,34 \pm 0,65$  в группе «Контроль», p < 0,05). Стоит отметить возможную роль эозинофилов в повреждении клеток почки: активированные эозинофилы способны индуцировать окислительный стресс, провоцирующий

гибель клеток [73]. Все указанные показатели свидетельствуют о токсическом поражении почек.

О нарушении функции почек при комбинированном воздействии НЧ SeO и НЧ CuO свидетельствует статистически значимый рост числа дегенеративных клеток проксимальных и дистальных канальцев почек (таблица 4.5.2). Проксимальные канальцы повреждаются в большей степени, чем дистальные. При гистологической оценке почек выражена потеря щеточной каемки (рисунок 4.5.1).

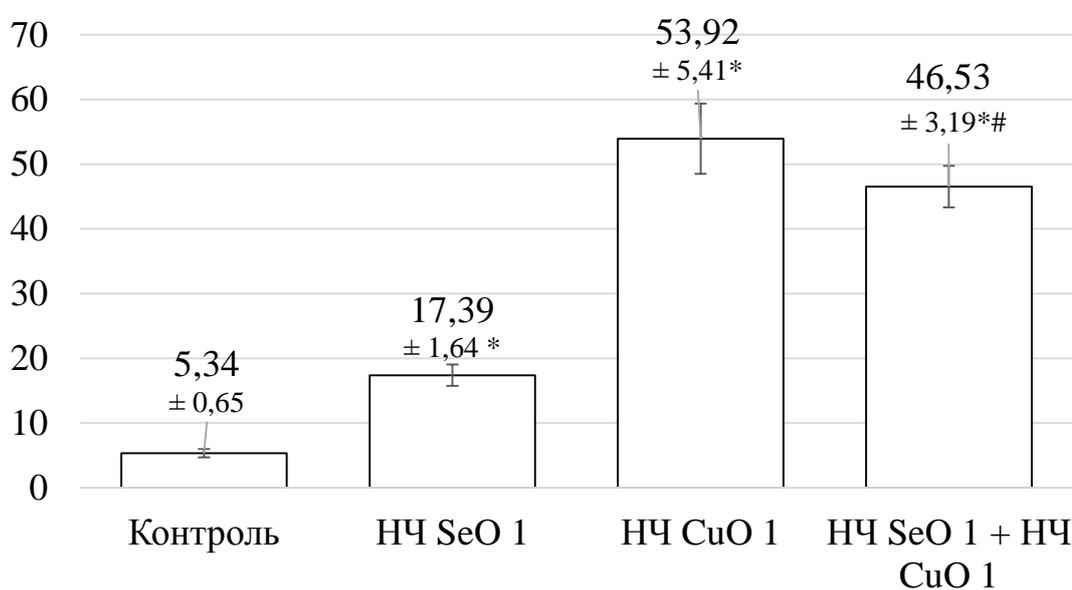


Рисунок 4.5.1 – Потеря щеточной каемки, %: по оси абсцисс указаны группы животных; по ординате отложены значения.

Примечание: значком «\*» отмечены значения, имеющие статистически значимые отличия от контрольной группы, «#» - от группы «НЧ SeO» (по t-критерию Стьюдента при  $p \leq 0,05$ )

Таблица 4.5.2 – Биохимические показатели состояния организма крыс, подвергшихся субхроническому воздействию разных доз наночастиц оксидов селена и/или меди ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1	НЧ CuO 0,5	НЧ CuO 1	НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 1	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5	НЧ SeO 1+ НЧ CuO 1
	*	2	3	4	5	6	7	8
Креатинин, ммоль/л	39,18 ± 1,63	37,63 ± 1,15	33,13 ± 1,35 <sup>*2</sup>	36,99 ± 1,11 <sup>3</sup>	38,70 ± 0,63 <sup>3</sup>	36,37 ± 2,68	34,02 ± 1,05 <sup>*24</sup>	35,13 ± 1,58
Мочевая кислота в моче, мкмоль/л	173,20 ± 9,36	223,17 ± 34,35	173,33 ± 44,33	188,00 ± 40,03	160,33 ± 6,17	163,00 ± 26,74	179,50 ± 19,50	114,00 ± 9,38 <sup>*247</sup>
Мочевина в моче, ммоль/л	209,06 ± 25,24	247,22 ± 29,58	270,41 ± 61,87	328,89 ± 85,68	141,94 ± 14,81 <sup>2</sup>	140,28 ± 18,46 <sup>23</sup>	229,30 ± 29,41 <sup>46</sup>	134,86 ± 9,29 <sup>*27</sup>
Общий белок в сыворотке крови, г/л	68,90 ±1,60	69,18 ± 0,88	64,40 ± 2,12	67,70 ± 0,81	68,51 ± 1,15	67,93 ± 0,68	68,67 ± 1,37	67,88 ± 1,82
Общий белок в моче, мг/л	232,16 ± 16,08	194,17 ± 28,60	377,35 ± 147,54	188,78 ±51,98	163,05 ±12,33*	167,28 ± 23,38	200,80 ±0,89	137,62 ±51,98* <sup>7</sup>
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках почек крыс, %								
Дегенеративные клетки проксимальных канальцев	6,33 ± 0,49	16,33 ± 0,92 <sup>*</sup>	17,33 ± 0,99 <sup>*</sup>	14,17 ± 0,75 <sup>*3</sup>	14,67 ± 0,49 <sup>*</sup>	13,50 ± 0,89 <sup>*2</sup>	9,33 ± 0,33 * <sup>2345</sup>	16,83 ± 0,70 <sup>*3458</sup>
Дегенеративные клетки дистальных канальцев	5,00 ± 0,58	7,00 ± 0,37 <sup>*</sup>	6,83 ± 0,48 <sup>*</sup>	6,17 ± 0,48	6,67 ± 0,33 <sup>*</sup>	7,00 ± 0,37 *	6,33 ± 0,42	7,33 ± 0,33 <sup>*</sup>
Эозинофилы	2,67 ± 0,33	4,50 ± 0,43 <sup>*</sup>	4,33 ± 0,49 <sup>*</sup>	4,83 ± 0,31 <sup>*</sup>	4,33 ± 0,42 <sup>*</sup>	4,67 ± 0,33 *	4,50 ± 0,43 *	4,00 ± 0,37 <sup>*</sup>
<i>Примечания.</i> Значком * показаны отличия от контрольной группы, числовыми обозначениями - от соответствующей опытной группы (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).								

При изолированном воздействии изменения, вызванные НЧ, более выражены, чем во всех группах комбинированного воздействия, что позволяет предположить ослабление вредного эффекта и антагонистический характер комбинированного действия НЧ. В группе «НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5» существенно снижается количество дегенеративных клеток дистальных канальцев (практически до уровня контрольных значений) и дегенеративных клеток проксимальных канальцев (статистически значимо с другими группами изолированного и комбинированного воздействия).

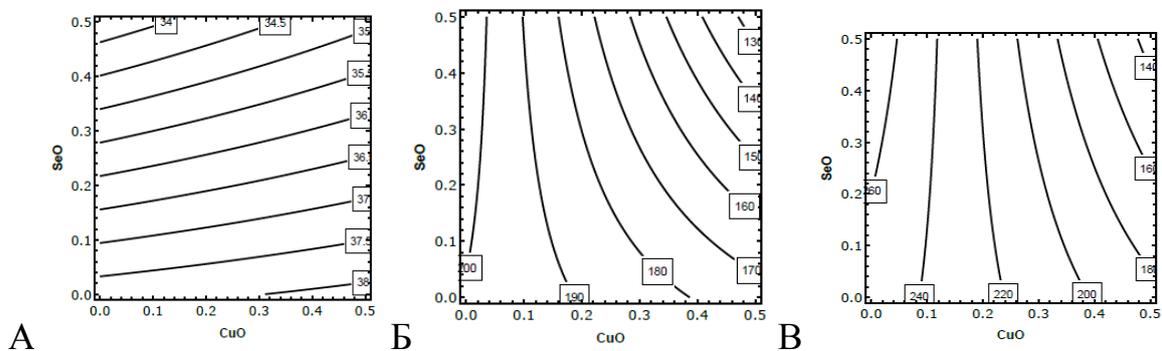


Рисунок 4.3.2 – Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированного действия НЧ оксидов селена и меди на различные показатели состояния почек: на уровень (А) креатинина в сыворотке крови, ммоль/л: преимущественно однофакторное действие НЧ SeO; (Б) мочевой кислоты в моче, мкмоль/л: преимущественно однофакторное действие НЧ CuO при низких дозах НЧ CuO, переходящее в аддитивность на высоких дозах НЧ; (В) мочевины в моче, ммоль/л: преимущественно однофакторное действие НЧ CuO, переходящее в аддитивность на высоких дозах НЧ. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изобологах обозначают величину эффекта

При RSM-анализе выявлена неоднозначность воздействия токсикантов на «почечные» показатели: преимущественно однофакторное действие НЧ SeO на уровень креатинина в сыворотке крови (рисунок 4.5.2 А) и НЧ CuO на

уровень мочевины (до аддитивного действия НЧ на высоких дозах токсикантов) и мочевой кислоты в моче (рисунок 4.5.2 Б, 4.5.2 В).

Комбинированное действие НЧ CuO и НЧ SeO на число дегенеративных клеток проксимальных канальцев почек характеризуется аддитивностью, переходящей в антагонизм при увеличении доз наночастиц, который сменяется потенцированием при сочетании наибольших исследованных в эксперименте доз наночастиц (рисунок 4.5.3 А). Выявлена аддитивность, переходящая в антагонизм при увеличении доз НЧ на число дегенеративных клеток дистальных канальцев почек (рисунок 4.5.3 Б).

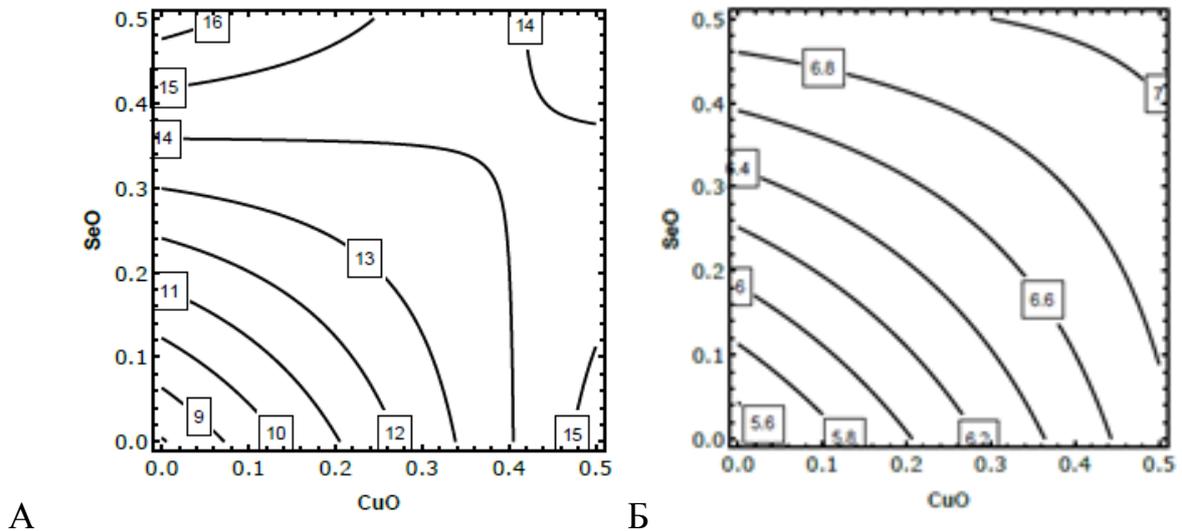


Рисунок 4.5.3 – Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированного действия селена и меди на число дегенеративных клеток канальцев в мазках-отпечатках почек: (А) проксимальных канальцев: аддитивность при сочетании низких доз НЧ, переходящая в антагонизм при увеличении доз наночастиц, который сменяется потенцированием при сочетании наибольших исследованных в эксперименте доз НЧ; (Б) дистальных канальцев: аддитивность, переходящая в скрытый антагонизм при увеличении доз НЧ. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта

#### 4.6 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние иммунных органов

Под воздействием НЧ SeO увеличивалось число эозинофилов (таблица 4.6.1) в мазках-отпечатках селезенки и брыжеечных лимфоузлов, что свидетельствует о способности НЧ SeO к запуску сигнальных каскадов в иммунокомпетентных клетках [73].

Таблица 4.6.1 – Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках иммунных органов ( $x \pm Sx$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,1	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках селезенки, %				
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	88,00 ± 0,856	83,17 ± 1,58 *	83,83 ± 1,9	83,33 ± 2,17
Плазмоциты	1,33 ± 0,211	2,17 ± 0,40	1,83 ± 0,54	2,50 ± 0,34 *
Макрофаги	1,17 ± 0,17	1,50 ± 0,22	1,33 ± 0,211	1,83 ± 0,17 *
Нейтрофилы	5,50 ± 0,56	6,83 ± 0,95	6,17 ± 0,83	5,50 ± 1,48
Эозинофилы	2,83 ± 0,54	4,83 ± 0,75*	5,50 ± 0,76 *	5,33 ± 1,26
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках брыжеечных лимфоузлов, %				
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	92,50 ± 1,04	90,71 ± 0,94	90,17 ± 0,48	85,20 ± 1,07 *#
Плазмоциты	1,25 ± 0,25	1,14 ± 0,14	1,67 ± 0,211	7,80 ± 1,16 *#
Эозинофилы	1,25 ± 0,25	3,71 ± 0,71*	3,33 ± 0,42 *	3,00 ± 0,55*
<i>Примечания.</i>				
Значком * показаны отличия от контрольной группы, # - НЧ SeO 0,5 (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).				

При комбинированном воздействии НЧ SeO и НЧ CuO повышается процентное соотношение нейтрофилов, эозинофилов и плазмоцитов в селезенке, эозинофилов, плазмоцитов в брыжеечных лимфоузлах (таблица

4.6.2). При анализе изоболограмм, полученных с помощью построения поверхности отклика, тип комбинированного действия НЧ SeO и НЧ CuO на состояние иммунокомпетентных органов различается при сочетании разных уровней доз НЧ. В качестве примера приведена изоболограмма, иллюстрирующая неоднозначность типа комбинированного действия на показатель процентного соотношения нейтрофилов в мазках-отпечатках лимфоузлов (см. рис. 4.6.1 А). Наблюдается ослабление токсического эффекта НЧ при низких дозах обоих токсикантов, противоположное действие изучаемых НЧ при повышении доз НЧ CuO и переход к аддитивному действию через потенцирование на высоких дозах обоих токсикантов. Сходное действие наблюдалось для процентного соотношения лимфобластов в мазках-отпечатках селезенки (рис. 4.6.1 Б). Отметим, что несмотря на наличие опосредованных НЧ эффектов в тканях селезенки и лимфатических узлах, не наблюдалось изменений клеточного состава крови.

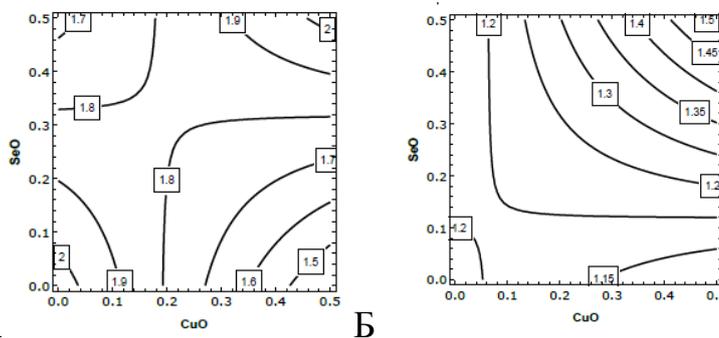


Рисунок 4.6.1 – Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированного действия селена и меди на состояние иммунокомпетентных органов: на процентное соотношение (А) нейтрофилов в мазках-отпечатках лимфоузлов: от аддитивности при низких дозах НЧ через явный антагонизм до потенцирования на высоких дозах НЧ; (Б) лимфобластов в мазках-отпечатках селезенки: от скрытого антагонизма на низких дозах НЧ через потенцирование при увеличении доз НЧ до аддитивности на высоких дозах НЧ. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта

Таблица 4.6.2 – Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках селезенки и лимфоузлов крыс, экспонированных к наночастицам оксидов селена и меди ( $\bar{X} \pm S_x$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1	НЧ CuO 0,5	НЧ CuO 1	НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 1	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5	НЧ SeO 1+ НЧ CuO 1
	*	2	3	4	5	6	7	8
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках селезенки крыс, %								
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	88,00 ± 0,856	83,83 ± 1,9	83,33 ± 2,17	79,17 ± 0,40 *	77,83 ± 0,87 *	79,00 ± 1,095 *	77,67 ± 1,17 *	79,17 ± 1,05 *
Плазмоциты	1,33 ± 0,211	1,83 ± 0,54	2,50 ± 0,34 *	2,67 ± 0,76	3,17 ± 0,31 *	6,50 ± 0,89* <sup>235</sup>	3,00 ± 0,25820* <sup>6</sup>	4,17 ± 0,79 * <sup>26</sup>
Макрофаги	1,17 ± 0,17	1,33 ± 0,211	1,83 ± 0,17 *	2,17 ± 0,40 *	2,00 ± 0,37	1,83 ± 0,17 *	1,67 ± 0,211	1,17 ± 0,17 <sup>38</sup>
Нейтрофилы	5,50 ± 0,56	6,17 ± 0,83	5,50 ± 1,48	7,33 ± 0,67	10,17 ± 0,87* <sup>234</sup>	6,67 ± 0,92 <sup>5</sup>	11,67 ± 0,49* <sup>2346</sup>	9,33 ± 0,71 * <sup>28</sup>
Эозинофилы	2,83 ± 0,54	5,50 ± 0,76 *	5,33 ± 1,26	7,17 ± 0,79 *	5,67 ± 0,92 *	4,50 ± 0,56 * <sup>4</sup>	4,50 ± 0,76	4,67 ± 0,56 *
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках лимфоузлов крыс, %								
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	92,50 ± 1,04	90,17 ± 0,48	85,20 ± 1,07 * <sup>2</sup>	86,00 ± 1,211 * <sup>2</sup>	88,40 ± 0,51 * <sup>3</sup>	89,80 ± 0,37* <sup>34</sup>	88,83 ± 0,95 *	89,60 ± 0,68 * <sup>34</sup>
Плазмоциты	1,25 ± 0,25	1,67 ± 0,211	7,80 ± 1,16 * <sup>2</sup>	8,33 ± 0,42 * <sup>2</sup>	5,40 ± 0,51 * <sup>24</sup>	2,40 ± 0,51 <sup>345</sup>	3,67 ± 0,71* <sup>234</sup>	5,60 ± 0,68* <sup>2467</sup>
Эозинофилы	1,25 ± 0,25	3,33 ± 0,42 *	3,00 ± 0,548 *	1,83 ± 0,65	1,60 ± 0,24 <sup>23</sup>	2,40 ± 0,24* <sup>5</sup>	1,67 ± 0,33 <sup>23</sup>	1,20 ± 0,20 <sup>236</sup>
Примечания. Значком * показаны отличия от контрольной группы, числовыми обозначениями - от соответствующей опытной группы (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).								

#### **4.7 Оценка воздействия наночастиц оксида селена изолированно и в комбинации с наночастицами оксида меди при субхроническом воздействии на состояние сердечно-сосудистой системы**

Обнаружены изменения со стороны сердечно-сосудистой системы. Впервые продемонстрировано неоднозначное влияние селена в форме НЧ на параметры АД. Под воздействием НЧ SeO у крыс снижается артериальное давление, статистически значимо в группах «НЧ SeO 0,1» и «НЧ SeO 0,5» (таблица 4.7.1). Литературные данные свидетельствуют о неоднозначности влияния селена на АД, связанные как с понижением [79], так и с его повышением [176]. Wells и соавт. предполагают U-образную зависимость между концентрацией селена в организме и АД [175], что согласуется с двойной ролью селена как микроэлемента, который, тем не менее, является токсикантом.

По показателям электрокардиограммы крыс (таблица 4.7.1), подвергавшихся воздействию НЧ SeO, наблюдается тенденция к дозозависимому снижению частоты сердечных сокращений (ЧСС) в I и II отведениях, которая приобретает значимость в группе «НЧ SeO 1». Интервал RR увеличивается обратно пропорционально ЧСС. Отмечается укорочение интервала QT в обоих отведениях на всех трех дозах НЧ SeO, при том во II отведении эти изменения статистически значимы. Снизилась амплитуда зубца T как во II, так и в I отведении, что в совокупности свидетельствует о нарушении процессов реполяризации миокарда. При ультраструктурной оценке ткани левого желудочка сердца не было обнаружено снижения процентного соотношения нормальных митохондрий (типа А и В по Mei G. Sun и соавт.,  $82,72 \pm 4,72$  % в группе «НЧ SeO 1» и  $83,39 \pm 5,35$  % в группе «Контроль»,  $p < 0,05$ ).

Таблица 4.7.1. – Показатели, характеризующие изменения состояния сердечно-сосудистой системы под воздействием НЧ SeO ( $\bar{X} \pm Sx$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,1	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1
<i>Биохимические показатели сыворотки крови</i>				
Концентрация эндотелина в сыворотке крови, пг/мл	487,24 ± 27,42	441,57 ± 15,37	475,73 ± 40,55	402,43 ± 30,12
<i>Гемодинамические показатели</i>				
Систолическое А.Д. мм.рт.ст.	138,83 ± 1,10	129,25 ± 3,26 *	128,40 ± 10,87	139,70 ± 6,65
Диастолическое А.Д. мм.рт.ст.	100,20 ± 3,01	88,92 ± 1,92 *	86,93 ± 9,12	93,98 ± 5,18
Среднее А.Д. мм.рт.ст.	114,42 ± 2,97	102,03 ± 2,28 *	100,41 ± 9,61	108,88 ± 5,54
<i>Показатели электрокардиограммы, I отведение</i>				
Интервал RR, мс	137,23 ± 3,98	137,16 ± 5,56	141,07 ± 6,40	151,69 ± 5,41
ЧСС, уд/мин	439,74 ± 12,76	443,51 ± 18,07	430,97 ± 18,55	388,46 ± 17,06 *♦
Интервал QRS, мс	26,81 ± 0,65	28,95 ± 0,84	26,76 ± 0,63	28,15 ± 1,0
Интервал QT, мс	57,13 ± 3,26	54,87 ± 0,43	52,53 ± 1,0	55,71 ± 1,45
Интервал QT скорректированный по Базетту (QTcB), мс кор.	154,32 ± 8,11	151,16 ± 5,12	140,76 ± 5,01	145,41 ± 2,38
Интервал QT скорректированный по Фредерике (QTcF), мс кор.	110,79 ± 5,96	108,34 ± 3,39	101,30 ± 2,99	105,95 ± 1,92
Амплитуда T, мВ	0,047 ± 0,016	0,0137 ± 0,0045	0,0265 ± 0,0038	0,047 ± 0,017
<i>Показатели электрокардиограммы, II отведение</i>				
Интервал RR, мс	138,98 ± 2,06	142,65 ± 5,78	148,80 ± 7,34	159,65 ± 7,58 *
ЧСС, уд/мин	433,82 ± 6,36	426,29 ± 16,93	411,28 ± 19,51	382,14 ± 18,24 *
Интервал QRS, мс	23,67 ± 0,27	22,54 ± 0,74	23,00 ± 0,55	24,39 ± 0,61
Интервал QT, мс	70,62 ± 1,05	64,40 ± 0,73 *	64,79 ± 1,10 *	65,92 ± 0,78 *
Интервал QT скорректированный по Базетту (QTcB), мс кор.	188,97 ± 1,68	171,41 ± 3,96 *	169,06 ± 4,00 *	163,72 ± 4,06 *
Интервал QT скорректированный по Фредерике (QTcF), мс кор.	136,10 ± 1,44	123,64 ± 2,19 *	122,73 ± 2,29 *	120,31 ± 2,35 *
Амплитуда T, мВ	0,186 ± 0,014	0,134 ± 0,027	0,158 ± 0,013	0,139 ± 0,011 *
<i>Примечание:</i>				
Статистически значимое отличие * - от контрольной группы; ♦ - от групп «НЧ SeO 1»; • - от группы «НЧ SeO 2» (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).				

Исходя из этого предполагается, что ведущий вклад в воздействии на сердечно-сосудистую систему не принадлежит токсическому действию на митохондрии. Вероятно, большее значение имеет опосредованный НЧ окислительный стресс: известно, что он способен провоцировать нарушение электрической проводимости миокарда за счет участия в развитии фокального фиброза и влияния на экспрессию коннексина, компонента межщелевых соединений кардиомиоцитов [45].

При комбинированном воздействии НЧ наблюдалось сходное изолированному снижению параметров артериального давления, из чего можно предположить аддитивный тип комбинированного действия (таблица 4.7.2). Обнаружено снижение гемодинамических показателей в группах, экспонированных к НЧ CuO, что позволяет предположить ведущую роль меди в снижении давления. С учетом отсутствия статистически значимых отличий в группах комбинированного воздействия от контрольных значений предполагается антагонизм.

Таблица 4.7.1. – Характеристики состояния сердечно-сосудистой системы крыс, подвергшихся воздействию наночастиц оксидов селена и / или меди ( $\bar{X} \pm S_x$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1	НЧ CuO 0,5	НЧ CuO 1	НЧ SeO 0,5 + НЧ CuO 1	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 0,5	НЧ SeO 1 + НЧ CuO 1
	*	2	3	4	5	6	7	8
Биохимические показатели сыворотки крови								
Концентрация эндотелина в сыворотке крови, пг/мл	487,24 ± 27,42	475,73 ± 40,55	402,43 ± 30,12	430,28 ± 33,33	409,59 ± 14,37*	391,48 ± 44,02	416,39 ± 35,86	366,03 ± 37,09*
Гемодинамические показатели								
Систолическое А.Д. мм.рт.ст.	138,83 ± 1,10	128,40 ± 10,87	139,70 ± 6,65	127,81 ± 7,67	137,66 ± 1,74	127,66 ± 8,24	135,21 ± 8,87	126,83 ± 6,04
Диастолическое А.Д. мм.рт.ст.	100,20 ± 3,01	86,93 ± 9,12	93,98 ± 5,18	78,63 ± 3,91* <sup>3</sup>	92,13 ± 1,77* <sup>4</sup>	84,49 ± 7,10	94,79 ± 7,37	86,74 ± 7,37
Среднее А.Д. мм.рт.ст.	114,42 ± 2,97	100,41 ± 9,61	108,88 ± 5,54	92,73 ± 4,38*	106,91 ± 1,29* <sup>4</sup>	98,56 ± 7,41	107,93 ± 7,84	101,65 ± 7,44
Показатели электрокардиограммы, I отведение								
Интервал RR, мс	137,23 ± 3,98	141,07 ± 6,40	151,69 ± 5,41	164,18 ± 8,87*	154,66 ± 7,27	141,51 ± 2,88 <sup>4</sup>	154,18 ± 5,68*	154,18 ± 8,93
ЧСС, уд/мин	439,74 ± 12,76	430,97 ± 18,55	388,46 ± 17,06*	372,69 ± 19,35*	392,84 ± 18,44	426,55 ± 9,27 <sup>4</sup>	394,03 ± 5,04* <sup>7</sup>	397,43 ± 21,67
Интервал QRS, мс	26,81 ± 0,65	26,76 ± 0,63	28,15 ± 1,0	28,68 ± 1,09	31,19 ± 2,69	29,66 ± 1,60	28,96 ± 1,46	28,00 ± 1,69
Интервал QT, мс	57,13 ± 3,26	52,53 ± 1,0	55,71 ± 1,45	59,51 ± 2,79 <sup>2</sup>	61,56 ± 2,46 <sup>2</sup>	60,90 ± 2,42 <sup>2</sup>	56,28 ± 1,33	61,94 ± 2,74 <sup>2</sup>
Интервал QT корр. по Базетту (QTcB), мс кор.	154,32 ± 8,11	140,76 ± 5,01	145,41 ± 2,38	147,77 ± 7,09	157,62 ± 8,59	160,21 ± 6,87	143,96 ± 3,15 <sup>8</sup>	160,15 ± 2,12 <sup>23</sup>
Интервал QT корр. по Фредерике (QTcF), мс кор.	110,79 ± 5,96	101,30 ± 2,99	105,95 ± 1,92	109,06 ± 5,02	115,18 ± 5,63	116,02 ± 4,77 <sup>2</sup>	107,30 ± 0,84 <sup>8</sup>	116,46 ± 1,54 <sup>23</sup>

Интервал PQ, мс	44,89 ± 1,19	45,77 ± 1,26	43,78 ± 0,89	44,57 ± 2,03	43,19 ± 0,55	48,61 ± 2,11 <sup>35</sup>	44,64 ± 1,24	44,73 ± 1,78
Амплитуда S, мВ	-0,0390 ± 0,0065	-0,0569 ± 0,0064	-0,0359 ± 0,0059 <sup>3</sup>	-0,0411 ± 0,0057	-0,0359 ± 0,0033 <sup>3</sup>	-0,058 ± 0,011	-0,0250 ± 0,0061 <sup>2</sup>	-0,0069 ± 0,0192 <sup>7</sup>
Амплитуда T, мВ	0,047 ± 0,016	0,0265 ± 0,0038	0,047 ± 0,017	0,0495 ± 0,0079 <sup>2</sup>	0,0228 ± 0,0018	0,052 ± 0,018	0,0360 ± 0,0040 <sup>5</sup>	0,087 ± 0,025 <sup>4</sup>
Показатели электрокардиограммы, II отведение								
Интервал RR, мс	138,98 ± 2,06	148,80 ± 7,34	159,65 ± 7,58 *	160,96 ± 7,13 *	160,28 ± 7,83 *	145,67 ± 4,31	151,97 ± 4,81 *	157,04 ± 8,00
ЧСС, уд/мин	433,82 ± 6,36	411,28 ± 19,51	382,14 ± 18,24 *	378,85 ± 16,37 *	381,29 ± 17,67 *	415,25 ± 12,07	398,35 ± 11,99 *	389,09 ± 19,58
Интервал QRS, мс	23,67 ± 0,27	23,00 ± 0,55	24,39 ± 0,61	24,97 ± 0,22 * <sup>2</sup>	24,33 ± 0,16 <sup>24(4)</sup>	23,89 ± 0,19 <sup>4</sup>	24,12 ± 0,57	23,78 ± 0,65
Интервал QT, мс	70,62 ± 1,05	64,79 ± 1,10 *	65,92 ± 0,78 *	68,82 ± 2,43	68,44 ± 1,02 <sup>2</sup>	69,83 ± 0,92 <sup>23</sup>	67,82 ± 1,94	67,83 ± 1,99
Интервал QT корр. по Базетту (QTcB), мс корр.	188,97 ± 1,68	169,06 ± 4,00 *	163,72 ± 4,06 *	172,40 ± 6,59 *	175,52 ± 5,94	183,69 ± 4,68 <sup>23</sup>	174,48 ± 5,19 *	172,86 ± 8,40
Интервал QT корр. по Фредерике (QTcF), мс корр.	136,10 ± 1,44	122,73 ± 2,29 *	120,31 ± 2,35 *	126,89 ± 4,57	128,96 ± 3,70	133,04 ± 2,81 <sup>23</sup>	127,31 ± 3,64	126,49 ± 5,26
Интервал PQ, мс	45,02 ± 1,53	43,10 ± 1,05	43,03 ± 1,26	45,35 ± 0,28	41,22 ± 0,82 <sup>*4</sup>	44,64 ± 1,29 <sup>5</sup>	46,76 ± 1,95 <sup>5</sup>	45,43 ± 1,47 <sup>5</sup>
Амплитуда S, мВ	0,0028 ± 0,0175	-0,028 ± 0,026	-0,018 ± 0,021	0,0083 ± 0,0157	-0,056 ± 0,025 <sup>4</sup>	-0,0091 ± 0,0159	-0,0043 ± 0,0195	-0,0018 ± 0,0210
Амплитуда T, мВ	0,186 ± 0,014	0,158 ± 0,013	0,139 ± 0,011 *	0,174 ± 0,013	0,1278 ± 0,0043 * <sup>4</sup>	0,168 ± 0,012 <sup>5</sup>	0,172 ± 0,012 <sup>5</sup>	0,157 ± 0,016
Примечания. Значком * показаны отличия от контрольной группы, числовыми обозначениями - от соответствующей опытной группы (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).								

При RSM-анализе выявлен аддитивный тип комбинированного действия изучаемых НЧ на уровень эндотелина-1 (рис. 4.7.1 А). Эндотелин-1 является известным сосудосуживающим агентом, и снижение его концентрации может являться одной из причин снижения АД через уменьшение общего периферического сосудистого сопротивления. Математический анализ комбинированного действия на уровень систолического артериального давления выявил разные типы со- и противонаправленного действия при разных соотношениях доз (рис. 4.7.1 Б), в том числе антагонизм на низких дозах обоих токсикантов. На рис. 4.7.1 В показано противонаправленное действие НЧ на показатель систолического артериального давления. Аналогичная картина наблюдалась для среднего артериального давления.

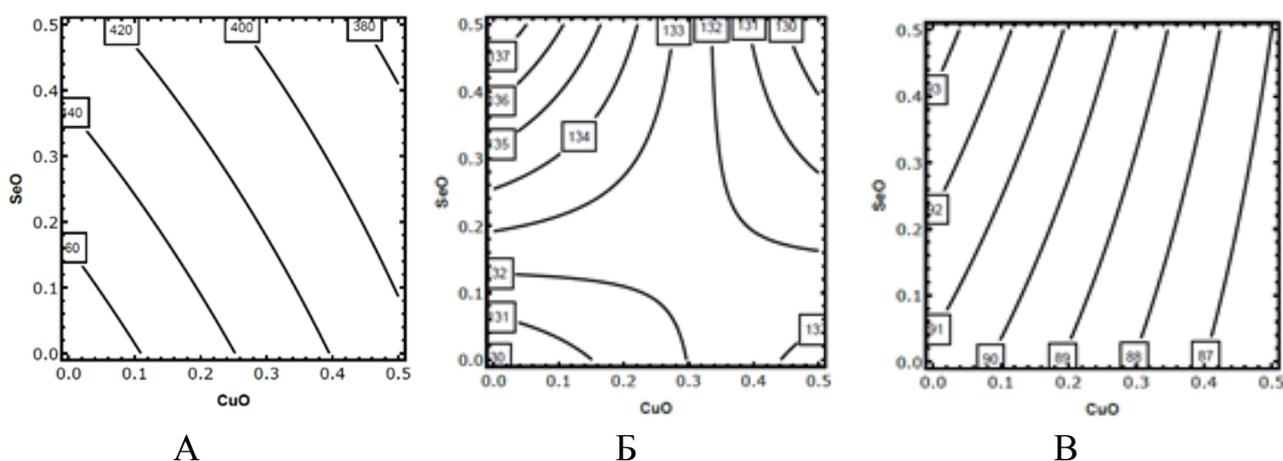


Рисунок 4.7.1 Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди на различные показатели состояния сердечно-сосудистой системы: (А) на концентрацию эндотелина: аддитивность; (Б) на систолическое артериальное давление: скрытый аантагонизм на низких дозах НЧ через явный антагонизм при сочетании высоких доз одних НЧ и низких доз других НЧ и потенцирование, переходящее в аддитивность на высоких дозах НЧ; (В) на диастолическое артериальное давление. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу: антагонизм; числа на изоболах обозначают величину эффекта

Воздействие НЧ изолированно и в комбинациях уменьшалась длительность интервала QT, в том числе и при коррекции по ЧСС. Это уменьшение происходило за счет укорочения сегмента ST, т.к. во всех опытных группах длительность комплекса QRS соотносима или превышает контрольные величины.

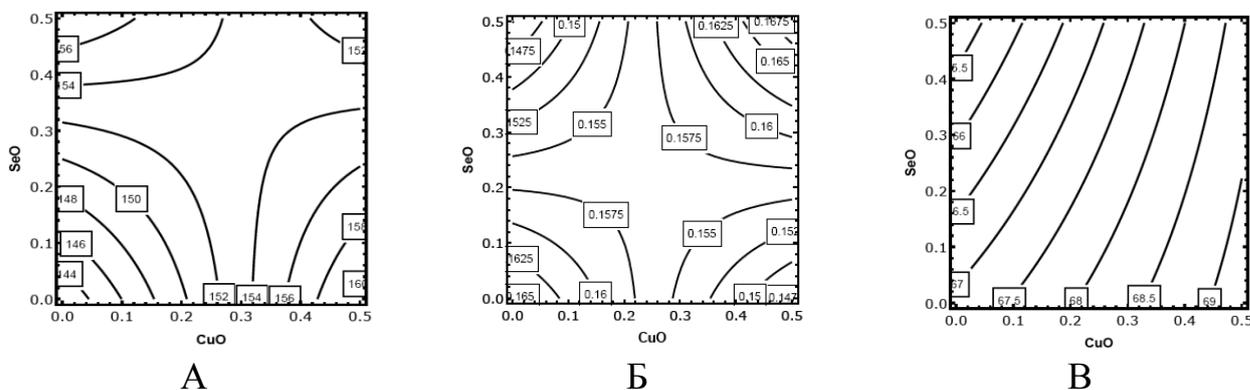


Рисунок 4.7.2. Примеры изоболограмм, иллюстрирующие неоднозначность типа комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди на различные показатели состояния сердечно-сосудистой системы: (А) на интервал RR во II отведении: сложная картина типов комбинированного действия от аддитивности при низких дозах НЧ через антагонизм при росте доз до аддитивности при высоких дозах НЧ; (Б) на амплитуду зубца Т во II отведении: сложная картина типов комбинированного действия от аддитивности при низких дозах НЧ через антагонизм при росте доз до потенцирования, переходящего в аддитивность при высоких дозах НЧ; (В) на интервал QT во II отведении: явный антагонизм с несколько большим вкладом НЧ CuO. На осях дозы соответствующих ЭО НЧ в мг на крысу; числа на изоболах обозначают величину эффекта

Длительность интервала RR возрастает за счет паузы между зубцами Т и Р, поскольку интервал PQ сравним с величиной в контрольной группе или ниже неё, а интервал QT в той или иной степени снижен в опытных группах. Увеличение паузы и тенденция к снижению амплитуды зубца Р могут говорить об ослаблении активности пейсмекеров или о повреждениях в них. Это может быть связано с повышенным оксидативным стрессом, вызываемым НЧ [136]. В той или иной

степени снизилась амплитуда зубца T (статистически значимо в группах «SeO 1», «CuO 1»). Изменение длительности QT вместе с тенденциями к снижению амплитуд зубцов S и T, вероятно, свидетельствуют о нарушении процессов реполяризации миокарда.

С учетом полученных данных, предполагается ведущая роль НЧ SeO в снижении интервала QT и увеличении интервала RR, а также неоднозначность комбинированного действия в изменении амплитуды зубца T. Анализ изоболограмм выявил неоднозначность типа комбинированного действия на изменение интервала RR и амплитуды зубца T (рисунок 4.7.2 А, Б), антагонизм с несколько большим вкладом НЧ CuO на изменение интервала QT (рисунок 4.7.2 В).

Ослабление функции сердца при комбинированном действии НЧ SeO и CuO проявилось снижением параметров артериального давления, частоты сердечных сокращений, удлинением паузы между циклами, и может быть следствием повышенного оксидативного стресса, вызываемого НЧ.

#### **4.8 Положительные эффекты наночастиц оксида селена при субхроническом воздействии**

Характерной особенностью действия наночастиц оксида селена в сравнении с другими метало-оксидными наночастицами [66, 83, 55] является способность наряду с вредными эффектами оказывать положительное действие на некоторые показатели состояния организма.

Снизилась ширина распределения эритроцитов по диаметру в группе «НЧ SeO 0,1» (таблица 4.8.1), что говорит о уменьшении гетерогенности клеточной популяции. Последнее наблюдается обычно при анемии, в том числе, после экспозиции некоторыми наночастицами [66]. Не изменился средний объем эритроцитов. Хотя и незначительно, но возросло содержание гемоглобина в эритроците. В совокупности эти показатели свидетельствуют о положительном влиянии низких доз НЧ SeO на кроветворение. Способность селена как

биомикроэлемента благоприятно влиять не только на эритропоэз, но и на гомеостаз железа известна из литературы [127].

Одновременно с реализацией токсических эффектов в печени происходит ослабление естественных деструктивных процессов, о чем свидетельствует снижение числа нейтрофилов в мазках-отпечатках печени под действием любой из использованных доз НЧ SeO (таблица 4.8.1). Снижение числа Купферовских клеток в группе «НЧ SeO 0,5» также можно отнести к гепатопротекторным эффектам НЧ SeO, поскольку известно, что этим клеткам принадлежит активная роль в утилизации остатков гепатоцеллюлярного апоптоза [122; 124].

Таблица 4.8.1. – Показатели, отражающие положительные эффекты наночастиц оксида селена при субхроническом воздействии ( $\bar{X} \pm Sx$ )

Показатель	Контроль	НЧ SeO 0,01	НЧ SeO 0,5	НЧ SeO 1
Гематологические показатели				
Ширина распределения эритроцитов, %	16,79 ± 0,39	14,90 ± 0,30 *	16,27 ± 0,44 #	15,53 ± 0,50
Средний объём эритроцита, мкм <sup>3</sup>	48,56 ± 0,88	49,56 ± 0,63	47,87 ± 0,71	47,26 ± 0,72 #
Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците, пг	20,47 ± 0,28	21,01 ± 0,46	20,58 ± 0,44	20,56 ± 0,51
Доля клеток разных типов в мазках-отпечатках печени крыс, %				
Нейтрофилы	8,67 ± 0,33	6,50 ± 0,43 *	6,50 ± 0,76 *	5,67 ± 0,67 *
Купферовские клетки	3,83 ± 0,31	3,50 ± 0,43	2,50 ± 0,43 *	3,83 ± 0,31 @
<i>Примечание:</i>				
Значком * показаны отличия от контрольной группы, # - НЧ SeO 0,01, @ - НЧ SeO 0,5 (p < 0,05 по t-критерию Стьюдента).				

Особенно важным положительным эффектом является статистически значимое в сравнении с контролем снижение уровня коэффициента фрагментации

геномной ДНК ядродержащих клеток крови, графически отображенное на рисунке 4.8.1.

Такие изменения можно связать с ролью селена как биомикроэлемента [62] и его известной антиоксидантной активностью [179]. Следует подчеркнуть, что, согласно данным литературы, элементные и элементо-оксидные наночастицы не только не проявляют подобного протекторного действия, но, напротив, повышают коэффициент фрагментации геномной ДНК [66, 198].

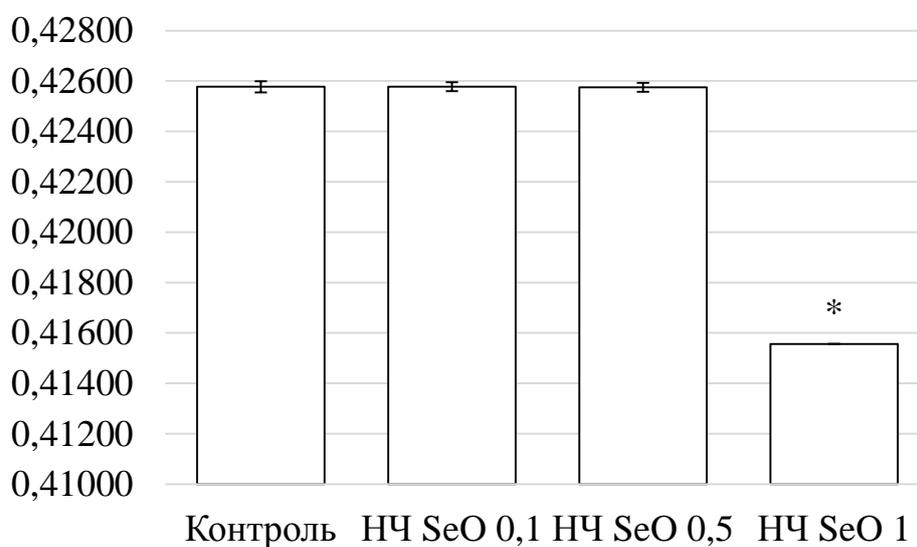


Рисунок 4.8.1 – Изменение уровня коэффициента фрагментации геномной ДНК ядродержащих клеток крови под воздействием наночастиц оксида селена ( $\bar{X} \pm S_x$ ). Значком \* показаны отличия от контрольной группы

Кроме того, оценка комбинированного действия при субхроническом воздействии обнаружила защитное действие низких доз наночастиц оксида селена на организм крыс на фоне интоксикации медью (антагонизм) в 43,9% случаев: в частности, по показателю активности СДГ в лимфоцитах крови (рисунок 4.3.2., рисунок 4.3.3) и ЩФ (таблица 4.4.2, рисунок 4.4.2 Б) в сыворотке крови, по числу дегенеративно-измененных гепатоцитов в мазках-отпечатках печени (таблица 4.4.2, рисунок 4.4.2 В), дегенеративных клеток проксимальных и дистальных канальцев в мазках-отпечатках почек (таблица 4.5.2., рисунок 4.5.3.).

## Резюме

В проведённом эксперименте *in vivo* в ответ на однократное интратрахеальное введение НЧ SeO в глубокие дыхательные вызывают приток общей клеточности и рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов. При комбинированном воздействии наночастицы оксида селена и наночастицы оксида меди вызывают приток общей клеточности, изменение абсолютного содержания нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов, изменения биохимического состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа с увеличением содержания ферментов в ней. Методами математического моделирования установлено, что комбинированное острое действие наночастиц оксидов селена и меди имеет потенцирующий характер.

В эксперименте *in vitro* установлено, что НЧ SeO способны влиять на биоэнергетический потенциал клеток, о чем свидетельствуют показатели интенсивности АТФ-зависимой люминисценции и скорости потребления кислорода клеточной культурой. Данные согласуются с результатами, полученными в независимом субхроническом эксперименте *in vivo*: со снижением активности сукцинатдегидрогеназы, числа нормальных и нормально-везикулярных митохондрий в клетках печени, изменением параметров метаболомного профиля в сыворотке крови с увеличением содержания ацилкарнитинов и их производных.

Обнаружена способность субхронической экспозиции *in vivo* наночастицами оксида селена при внутрибрюшинном введении приводить к развитию нарушений в организме, даже если воздействие происходит на низком уровне доз. Негативное действие на состояние организма крыс отмечалось по снижению активности сукцинатдегидрогеназы, показателям состояния печени, почек и сердечно-сосудистой системы. Наряду с этим, показано положительное действие той же экспозиции: по влиянию на красную кровь и гомеостаз железа; по вероятному снижению гепатоцеллюлярного апоптоза; по снижению коэффициента фрагментации геномной ДНК, что можно связать с ролью селена как биомикроэлемента и его известной антиоксидантной активностью.

Комбинированная токсичность наночастиц оксидов селена и меди (как острая при интратрахеальном, так и субхроническая при внутрибрюшинном воздействии) неоднозначна и подчиняется общим закономерностям. Методами математического моделирования установлен преимущественно потенцирующий характер острого комбинированного действия наночастиц селена и меди. При субхроническом воздействии преобладающим типом комбинированного действия являлась аддитивность. Это обстоятельство делает актуальной задачу повышения резистентности организма к действию рассматриваемой комбинации с помощью средств биопрофилактики, чему будет посвящена следующая глава.

## **ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ БИОПРОТЕКТОРНОГО КОМПЛЕКСА, КУПИРУЮЩЕГО РАЗВИТИЕ ВРЕДНЫХ ЭФФЕКТОВ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ СЕЛЕНА И МЕДИ**

### **5.1 Обоснование выбора биопротекторов, купирующих развитие вредных эффектов при комбинированном воздействии наноксидов селена и меди**

Коллективом отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора последние три десятилетия разрабатывается и внедряется подход, направленный на повышение устойчивости организма к токсическим воздействиям различных химических веществ, включая их наноразмерные формы – «биологическая профилактика» [7, 12, 15, 43, 63].

Основной принцип выбора средств для проведения биологической профилактики состоит в подборе комплексов биопротекторов (БПК), сочетающих различные механизмы защитного действия. К таковым относятся неспецифическое повышение резистентности организма, стимуляция токсикокинетических процессов, воздействие на основные токсикодинамические звенья интоксикации.

Исходя из предполагаемых механизмов действия SeO НЧ в комбинации с CuO НЧ, теоретических предпосылок и имеющегося опыта биологической профилактики вредных эффектов различных токсических веществ был составлен БПК, включавший в себя: питье, которое полностью заменяло бутилированную воду: 1,5 % раствор глутамата натрия; диетическую добавку в корм, (дозировка указана из расчета на одно животное): глицин (12 мг), рутин и витамин С (по 1,4 мг), смесь омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (с преобладанием докозагексаеновой кислоты не менее 45 % и эйкозапентаеновой кислоты не менее 40 %, общим объемом 13,3 мг), ретинол (1,3 мкг), цианкоболамин, (0,69 мкг), витамин D3 (холекальциферол, 1,04 мг).

Ранее исследованиями коллектива отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора были продемонстрированы наиболее общие закономерности вредного действия на организм наночастиц [49], в числе которых показаны однотипные ультраструктурные изменения клеток: повреждение митохондрий с частичной или полной потерей крист, вакуолизация цитоплазмы, образование в ней концентрических мембранных включений. По данным литературы так же показана принципиальная возможность Se-НЧ оказывать цитотоксическое действие [59, 68]. Поэтому в состав комплекса были включены глютаминовая кислота в виде ее натриевой соли («глутамата») и глицин - как предшественники биосинтеза восстановленного глутатиона, являющегося системным протектором от оксидативного и свободно-радикального повреждения клетки и субклеточных структур, что характеризует первичные механизмы цитотоксичности. Глутамат дополнительно является мембрано-стабилизирующим и, тем самым, анти-цитотоксическим фактором. Подобное его действие связано с интенсификацией синтеза АТФ [17]. Так же он относится к числу веществ, действующих одновременно как стимуляторы окислительно-энергетического обмена и как естественные физиологически активные метаболиты, повышающие неспецифическую сопротивляемость и активность компенсаторно-репаративных процессов [30].

Важным механизмом токсичности наночастиц и наноматериалов является способность провоцировать образование активных форм кислорода, что может, в свою очередь вызывать окислительный стресс [136]. Прооксидантное действие показано для НЧ  $TiO_2$  [163]. Индуцировать окислительный стресс способны, например, НЧ  $CoO$  [82], НЧ  $Cu$  [85]. Опосредованно к увеличению продукции АФК может приводить активация макрофагов и нейтрофилов под влиянием НЧ золота [151], НЧ  $ZnO$  [115]. Аналогичное действие предполагается для Se-НЧ [61, 119, 137]. Индуцирование окислительного стресса [43, 61, 119, 137, 210] селеном происходит путем образования метилселенида [137] либо свободных радикалов, что приводит к образованию аниона селенида [119]. В результате развития окислительного стресса клетки не могут поддерживать нормальные

физиологические функции, регулируемые окислительно-восстановительным потенциалом. Это, в свою очередь, приводит к повреждению ДНК, нерегулируемой передаче клеточных сигналов, изменению подвижности клеток, цитотоксичности, апоптозу и, в конечном итоге, может быть причиной канцерогенеза [136].

Существенная патогенетическая роль окислительного стресса и свободных радикалов в реализации токсического действия является основанием для поиска путей коррекции экзогенными антиоксидантами. Для нивелирования прооксидантных эффектов НЧ SeO в БПК были включены антиоксиданты: рутин и витамины А, С. Рутин - представитель группы флавоноидов, экзогенных природных антиоксидантов. Он обладает широким спектром биологического действия, в том числе антирадикальной активностью [14], что актуально для нейтрализации токсического действия НЧ SeO и НЧ CuO. Флавоноиды рекомендуется к использованию в рамках антифиброзной терапии, поскольку они способны снижать интенсивность воспалительных процессов, ингибируя инфильтрацию макрофагов [200]. Так же рутин в силу своих антиоксидантных свойств предохраняет аскорбиновую кислоту от избыточного окисления, способствуя сохранению ее биологической активности и депонированию в тканях организма [11]. Аскорбиновая кислота обладает выраженными антиоксидантными свойствами, участвует в регулировании окислительно-восстановительных и метаболических процессов, усиливает эффекты рутина [11]. Исследования уровней витамина С в плазме и антиоксидантной способности у некоторых животных показывает значительную положительную корреляцию между содержанием аскорбиновой кислотой и антиоксидантной способностью плазмы. Аскорбиновая кислота экзогенной природы на грызунов, как правило, имеет незначительное влияние, однако известно о положительных эффектах дополнительно введенного в рацион витамина С [64]. Витамин А был включен в состав комплекса в качестве антиоксиданта, для подавления свободнорадикальных реакций в липидном бислое клеток [118, 154]

На примере изученных ранее коллективом отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора наночастиц (НЧ Au,

НЧ Ag, НЧ PbO, НЧ CdO, НЧ NiO, НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, НЧ TiO, НЧ SiO<sub>2</sub> и др.), включая наночастицы металлов, являющихся эссенциальными элементами (НЧ CuO, НЧ ZnO), было продемонстрировано генотоксическое действие *in vivo*, о котором косвенно судили по повышению коэффициента фрагментации ядерной ДНК различных органов и тканей. В связи с этим в состав БПК были включены полиненасыщенные жирные кислоты класса ω-3 (ПНЖК ω-3), способные оказывать геном-протекторный эффект [105]. Кроме того, внутриклеточным производным ПНЖК ω-3 являются эйкозаноиды. Эйкозопентаеновая кислота принимает участие в формировании клеточных мембран, в регулировании воспалительных реакций, улучшении всасывания жиров и жирорастворимых витаминов (в состав комплекса были введены витамины также А и D). Докозагексаеновая кислота участвует в нормализации микроциркуляции крови, обладает мембранозащитным, иммуномодулирующим, противовоспалительным, противоаллергическим действием [11, 42].

Воспалительная реакция, помимо мобилизации нейтрофильных лимфоцитов в рамках реализации естественного механизмов самоочищения легких от наночастиц при их вдыхании, может быть опосредована медью, вызывающей острые воспалительные изменения легочной ткани и повышение проницаемости сосудов [49]. Витамин D был введен в состав биопротекторного комплекса, поскольку способен подавлять воспалительный ответ [157, 126].

Поскольку системная токсичность наночастиц зависит от их химической природы, включая токсические эффекты, характерные для этого металла [49], в состав комплекса был включен витамин B12. Согласно литературным данным [210], он участвует в реакциях синтеза S-аденозилметионина, способствующего снижению токсического действия селена и его выведению из организма и способствующего снижению вредного действия селена [106].

## 5.2 Испытание эффективности биопрофилактического комплекса при комбинированном воздействии наноксидов селена и меди

Под влиянием БПК в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК» основные цитологические характеристики БАЛЖ - общее число клеток, число НЛ и отношение НЛ/АМ были существенно и статистически значимо снижены в сравнении с соответствующими показателями группы «НЧ SeO + НЧ CuO» (таблица 5.2.1).

Таблица 5.2.1 – Число клеток в жидкости, полученной при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам комбинации суспензий наночастиц оксидов селена и меди и влияние БПК на эти показатели ( $X \pm S_x$ )

Цитологические показатели		Число клеток* 10 <sup>6</sup>				НЛ/АМ
		общее	лимфоциты	НЛ	АМ	
Группы крыс	Контроль	3,62 ± 0,35	0,130 ± 0,030	0,68 ± 0,11	2,57 ± 0,19	0,264 ± 0,043
	НЧ SeO + НЧ CuO	15,97 ± 3,88 *	0,81 ± 0,19 *	10,24 ± 2,72 *	4,93 ± 1,23	2,16 ± 0,43 *
	НЧ SeO + НЧ CuO + БПК	6,04 ± 0,17 *♦	0,203 ± 0,069 ♦	2,84 ± 0,30 *♦	2,85 ± 0,19	1,04 ± 0,13 *♦
	БПК	2,74 ± 0,50	0,136 ± 0,022 ♦	0,543 ± 0,083	1,69 ± 0,40	0,51 ± 0,11 *

*Примечание:*  
Статистически значимое отличие \* - от контрольной группы, ♦ - от группы «НЧ SeO + НЧ CuO» ( $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

По числу АМ отмечается недостаточно статистически значимая, но благоприятная тенденция, отмечено некоторое их повышение в группе «НЧ SeO + НЧ CuO» и нормализация в сравнении с контролем в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК». Отметим также нормализацию уровня лимфоцитов в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК» в сравнении с группой «НЧ SeO + НЧ CuO».

Практически все цитологические показатели у крыс, получавших только БПК, не отличались от контрольных значений. Исключение составляет соотношение НЛ/АМ, статистически значимое повышение которого произошло за

счет недостоверного снижения АМ, но не притока НЛ. Предположительно, полученный эффект можно объяснить нормальным колебанием числа альвеолярных макрофагов в легочной ткани крыс.

При интратрахеальном введении комбинации наночастиц НЧ SeO и CuO в надосадочной жидкости БАЛ отмечалось статистически значимое увеличение содержания АсАТ, АлАТ, ЛДГ и амилазы (таблица 5.2.2).

Таблица 5.2.2 – Биохимические показатели надосадочной жидкости, полученной при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам комбинации суспензий наночастиц оксидов селена и меди и влияние БПК на эти показатели ( $X \pm S_x$ )

Биохимические показатели		АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	Амилаза, Е/л	ЛДГ, Е/л
Группы крыс	Контроль	1,98 ± 0,28	11,18 ± 1,51	2,629 ± 0,064	34,29 ± 2,10
	НЧ SeO + НЧ CuO	3,01 ± 0,34 *	26,10 ± 5,07 *	44,10 ± 17,05 *	84,56 ± 20,88 *
	НЧ SeO + НЧ CuO + БПК	2,97 ± 0,40	13,45 ± 2,37 ♦	19,02 ± 4,25 *	72,44 ± 18,25
	БПК	<b>2,97 ± 0,18 *</b>	12,77 ± 1,83	2,79 ± 0,22	25,71 ± 3,91
<i>Примечание:</i> Статистически значимое отличие * - от контрольной группы, ♦ - от группы «НЧ SeO + НЧ CuO» ( $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).					

После проведения предварительного курса биологической профилактики в группе «НЧ SeO+ НЧ CuO + БПК» были нормализованы уровни маркерных ферментов цитолиза уровня контрольной группы – АсАТ, АлАТ и ЛДГ. Уровень амилазы остался статистически значимым с контрольной группой, хотя и был существенно снижен. Статистически значимо был снижен АсАТ.

Снижение активности лизосомальных ферментов и ферментов цитолиза в надосадочной жидкости БАЛЖ обусловлено сложными механизмами защитного действия входящих в комплекс биопротекторов. Особое значение имеет мембраностабилизирующее действие глутамата, поскольку оно может препятствовать

повреждению митохондрий и тем самым оксидативному стрессу, являющемуся, по современным представлениям, одним из основных механизмов цитотоксического действия.

Показатели фагоцитоза НЛ и АМ, полученных при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам комбинации суспензий наночастиц оксидов селена и меди и влияние БПК на эти показатели, представлено в таблице 5.2.3.

Таблица 5.2.3. – Показатели фагоцитоза НЛ и АМ, полученных при БАЛ через 24 часа после интратрахеального введения крысам комбинации суспензий наночастиц оксидов селена и меди и влияние БПК на эти показатели ( $X \pm S_x$ )

Показатель		Активность фагоцитоза, процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа		Индекс фагоцитоза, среднее число частиц латекса, поглощенных одной клеткой		НСТ-тест, % восстановленных фагоцитом гранул растворимого красителя НСТ в нерастворимый диформазан
		АМ	НЛ	АМ	НЛ	
Группы крыс	Контроль	10,60 ± 0,60	9,40 ± 0,40	1,190 ± 0,077	1,060 ± 0,024	1,43 ± 0,20
	НЧ SeO + НЧ CuO	11,60 ± 1,44	21,20 ± 0,49 *	1,240 ± 0,087	2,080 ± 0,058 *	3,00 ± 0,67
	НЧ SeO + НЧ CuO + БПК	17,50 ± 3,80	18,25 ± 1,97 *	1,50 ± 0,20	1,93 ± 0,30	1,17 ± 0,17 ♦
	БПК	10,50 ± 0,50	9,50 ± 1,50	1,150 ± 0,050	1,050 ± 0,050	2,83 ± 0,98

Примечание:

Статистически значимое отличие \* - от контрольной группы, ♦ - от группы «НЧ SeO + НЧ CuO» ( $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

После проведения предварительного курса биологической профилактики практически неизменным остался процент НЛ, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа, однако нормализовалось до уровня контрольных значений среднее число частиц латекса, поглощенных одним НЛ (таблица 5.2.3). Результаты НСТ-теста в группе комбинированного воздействия НЧ не отличались от контрольных значений, что свидетельствует об отсутствии изменений во внутриклеточной

НАДФ-Н-оксидазной системе фагоцита (таблица 5.2.3). В то же время, в группе «НЧ SeO + НЧ CuO + БПК» процент восстановленных фагоцитом гранул растворимого красителя НСТ в нерастворимый диформазан снизился в сравнении с группой «НЧ SeO + НЧ CuO».

Воспалительная реакция, помимо мобилизации НЛ в рамках реализации естественного механизма самоочищения легких от ЭОНЧ, может быть также опосредована медью, вызывающей острые воспалительные изменения легочной ткани [96, 104, 156]. Воспалительный ответ способны подавлять такие компоненты БПК, как  $\omega$ -3 ПНЖК [75], витамин D3 [99], рутин [50, 201], витамин С [78, 188].

## Резюме

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об ослаблении цитотоксического действия изученной комбинации НЧ SeO и CuO после проведения предварительного курса биологической профилактики. Большое значение имеет разное по молекулярным механизмам противорадикальное (в том числе, антиоксидантное) действие, в той или иной степени присущее ряду биопротекторов заявляемого комплекса (антиоксидантный синергизм).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При целенаправленном применении специально синтезированных селенсодержащих наночастиц с заданными свойствами для нужд медицины, науки, промышленности и сельского хозяйства чаще учитываются их положительные свойства, но не эффекты токсического действия на клеточном и органо-системном уровне. Кроме того, потенциальные и фактические риски для здоровья человека связаны с высокими объемами добычи селена и широким его применением в промышленности, поскольку наряду с субмикронными частицами более 100 нм при высокотемпературных процессах и некоторых процессах механической обработки материалов образуются наноаэрозоли сложного состава.

Проведенное исследование показало, что в результате однократного интратрахеального введения наночастицы оксида селена *in vivo* вызывают приток общей клеточности и рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов. Не изменился биохимический состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Указанные изменения могут быть следствием самого по себе интратрахеального введения малорастворимых частиц. При комбинированном воздействии наночастицы оксида селена и наночастицы оксида меди вызывают выраженную реакцию глубоких дыхательных путей, которая проявляется изменением цитологических (приток общей клеточности, абсолютное содержание нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов, их соотношение, фагоцитарная активность) и биохимических показателей состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Методами математического моделирования установлено, что комбинированное острое действие наночастиц оксидов селена и меди имеет потенцирующий характер.

Установлена способность наночастиц оксида селена в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo* нарушать биоэнергетические процессы клеток, о чем судили по снижению АТФ-зависимой люминесценции и скорости потребления кислорода клетками в монослойной культуре фибробластоподобных клеток; по снижению активности сукцинатдегидрогеназы, числа нормальных и нормально-

везикулярных митохондрий в клетках печени, изменением параметров метаболомного профиля сыворотке крови с увеличением содержания ацилкарнитинов и их производных *in vivo* в независимом субхроническом эксперименте.

Доказано влияние наночастиц оксида селена в субхроническом эксперименте *in vivo* на состояние печени, почек, сердечно-сосудистой системы как изолированно, так и в комбинации с наночастицами оксида меди. Изменялись функциональные, гистоморфометрические, цитологические характеристики печени. По данным метаболомного исследования сыворотки крови снизилась интенсивность аналитического сигнала для гликохолевой кислоты и лизофосфатидилхолинов. Последнее согласуется с литературными данными о возможности селена, в том числе в наноразмерной форме, влиять на синтез липидов. Изменялись гистоморфометрические и цитологические характеристики почек, что выражалось увеличением доли дегенеративных клеток проксимальных и дистальных канальцев, потерей щеточной каемки. Обнаружено влияние на состояние сердечно-сосудистой системы: изменялись параметры электрокардиограммы, впервые продемонстрировано влияние наночастиц оксида селена на параметры артериального давления. Наряду с этим показано положительное действие той же экспозиции наночастиц оксида селена, главным образом по снижению коэффициента фрагментации геномной ДНК. Методами математического моделирования установлено, что ведущим типом субхронического комбинированного действия наночастиц оксидов селена и меди является аддитивность.

Теоретически обоснован и экспериментально оценен комплекс биопротекторов, повышающий резистентность организма к вредному комбинированному действию наночастиц оксида селена и меди, судя по снижению соотношения нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости.

## ВЫВОДЫ

1. Статистический анализ данных производственного контроля уровня содержания селена показал, что аппаратчики в производстве редких металлов селенового отделения медеплавильного предприятия подвергаются воздействию аэрозолей сложного состава, содержащих селен, превышающий среднесменный уровень ПДК на 25,5%.

2. В результате однократного интратрахеального введения наночастицы оксида селена *in vivo* вызывают приток общей клеточности на 48%,  $p < 0,05$ , рост фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов в 2 раза,  $p < 0,05$ . При комбинированном воздействии наночастицы оксида селена и наночастицы оксида меди вызывают приток общей клеточности в 3,4 раза,  $p < 0,05$ ; изменение абсолютного содержания нейтрофильных лейкоцитов и альвеолярных макрофагов – в 14 и 2 раза соответственно,  $p < 0,05$ , их соотношения – в 7,3 раза,  $p < 0,05$ , и фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов – в 2 раза,  $p < 0,05$ ; изменения биохимического состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа с увеличением содержания ферментов в ней. Методами математического моделирования установлено, что комбинированное острое действие наночастиц оксидов селена и меди имеет потенцирующий характер.

3. В условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo* установлено, что наночастицы оксида селена вызывают нарушение биоэнергетических процессов, что проявляется *in vitro* в монослойной культуре фибробластоподобных клеток снижением АТФ-зависимой люминесценции на 75%,  $p < 0,05$ , и скорости потребления кислорода клетками на 80%,  $p < 0,05$ ; *in vivo* в независимом субхроническом эксперименте – снижением активности сукцинатдегидрогеназы на 16%,  $p < 0,05$ , снижением числа нормальных и нормально-везикулярных митохондрий в клетках печени на 7,78%,  $p < 0,05$ , изменением параметров метаболомного профиля в сыворотке крови с увеличением содержания ацилкарнитинов и их производных,  $p < 0,05$ .

4. Наночастицы оксида селена в условиях субхронического эксперимента *in vivo* нарушают функцию печени (снижение уровня гликолевой кислоты в сыворотке крови,  $p < 0,001$ ; повышение уровня аланинаминотрансферазы в сыворотке крови на 30%,  $p < 0,05$ ), изменяют гистоморфометрические (рост числа безъядерных гепатоцитов в 3,1 раза,  $p < 0,05$ ) и цитологические (рост числа дегенеративно-измененных гепатоцитов в 2,2 раза,  $p < 0,05$ ) характеристики органа. При комбинированном воздействии наночастиц оксидов селена и меди показан аддитивный эффект по изменению числа дегенеративно-измененных гепатоцитов, уровня аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.

5. Наночастицы оксидов селена в условиях субхронического эксперимента *in vivo* оказывают влияние на морфологические характеристики почек (увеличение потери щеточной каемки в 3,2 раза,  $p < 0,05$ ; рост числа дегенеративных клеток проксимальных канальцев в 2,7 раза, дистальных канальцев – в 1,3 раза,  $p < 0,05$ ). При комбинированном воздействии наночастиц оксидов селена и меди показан аддитивный эффект по этим показателям.

6. Наночастицы оксидов селена в условиях субхронического эксперимента *in vivo* оказывают влияние на состояние сердечно-сосудистой системы (снижение систолического и диастолического артериального давления на 6,5 % и на 11,3% соответственно,  $p < 0,05$ ; снижение частоты сердечных сокращений на 11,8%,  $p < 0,05$ , укорочение интервала QT на 7,1 %,  $p < 0,05$  и снижение амплитуды зубца T на 25,3%,  $p < 0,05$ ). При комбинированном воздействии наночастиц оксида селена и наночастиц оксида меди показан аддитивный эффект на систолическое артериальное давление, длительность интервала RR и амплитуду зубца T.

7. Резистентность организма к вредному комбинированному действию наночастиц оксида селена и меди повышалась при применении теоретически обоснованного и экспериментально оцененного комплекса биопротекторов, который вызвал значительное снижение токсичности (снижение коэффициента НЛ/АМ в 2 раза,  $p < 0,05$ ).

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**Результаты экспериментальной апробации биопрофилактического комплекса, повышающего устойчивость организма к вредному комбинированному действию наночастиц оксидов селена и меди, позволяют обосновать целесообразность использования тех же биопротекторов в целях биологической профилактики хронических профессиональных и производственно обусловленных заболеваний, вызванных комбинированным воздействием селена и меди, в том числе в наноразмерной форме, в первую очередь рабочих металлургических предприятий, занятых в химико-металлургических и шламовых цехах при производстве селена из медных шламов, при производстве литой стали, нержавеющей сталей.**

**Учреждениям высшего профессионального образования материалы рекомендуются для внедрения в учебный процесс: использовать в лекционном курсе и на практических занятиях по дисциплинам «Гигиена труда», «Коммунальная гигиена» для студентов медико-профилактического факультета.**

**Контрольно-надзорным органам в области охраны труда и здоровья работников** рекомендуется при оценке потенциального риска для здоровья лиц, подвергающихся комбинированному воздействию наночастиц оксида селена и меди, не ограничиваться суммированием однофакторных рисков, а учитывать необходимость дополнительного запаса надежности для сохранения здоровья в условиях токсического действия.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанный биопрофилактический комплекс может быть рекомендован для дальнейших исследований в контролируемом курсе на рабочих медеплавильных предприятиях. Оценка эффективности такого курса биопрофилактики должна проводиться на основании клинико-лабораторного обследования непосредственно перед началом курса и сразу после его окончания.

Дальнейшее продолжение токсиколого-гигиенических исследований (включая изучение отдаленных эффектов) может способствовать обоснованию ориентировочно безопасного уровня воздействия НЧ SeO в воздухе производственных помещений и атмосферном воздухе населенных мест.

Дальнейшее изучение особенностей механизмов токсикодинамики и токсикокинетики селенсодержащих наночастиц (на примере НЧ SeO), в том числе на молекулярном уровне, может способствовать выявлению фундаментальных механизмов действия наночастиц оксида селена. Такое действие может быть принято во внимание с целью разработки специализированного метода диагностики и включения его в комплексное клинико-лабораторное обследование групп риска (рабочие промпредприятий и население, экспонируемое к селенсодержащим наночастицам).

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

RSM	– Response Surface Methodology (метод поверхностей отклика)
CuO НЧ	– наночастицы оксида меди
SeO НЧ	– наночастицы оксида селена
Se-НЧ	– селенсодержащие наночастицы
АД	– артериальное давление
АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АМ	– альвеолярные макрофаги
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
АФ	– активность фагоцитоза
АФК	– активные формы кислорода
БАЛ	– бронхоальвеолярный лаваж
БАЛЖ	– бронхоальвеолярная лаважная жидкость
БПК	– биопрофилактический комплекс
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ГТП	– $\gamma$ -глутамилтранспептидаза
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФ	– индекс фагоцитоза
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
МДА	– малоновый диальдегид
MeO НЧ	– металлооксидные наночастицы
НЛ	– нейтрофильные лейкоциты
НСТ-тест	– спонтанный тест с нитросиним тетразолием
НЧ	– наночастицы
ПНЖК	– полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ	– перекисное окисления липидов
СДГ	– сукцинатдегидрогеназа
с.с.	– среднесменная
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
ЧСС	– частота сердечных сокращений
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭКГ	– электрокардиограмма
ЭО НЧ	– элементно-оксидные наночастицы

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Андреева, Л.И. Модификации метода определения перекиси липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабор. дело. 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. АсАТиани, В.С. Определение глутатиона по Кей и Мерфиту: Новые методы биохимической фотометрии / В.С. АсАТиани // М.: Наука, 1965. – С. 158–159.
3. Бестужева, С.В. Определение церулоплазмина в сыворотке крови модифицированным методом Ревина: Клиническая биохимия / С.В. Бестужева, В.Г. Колб. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 219–220.
4. Биохимические эффекты у рабочих, подвергающихся влиянию аэрозолей металлургического производства меди, содержащих наночастицы / В.Б. Гурвич, Б.А. Кацнельсон, В.О. Рузаков [и др.] // Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоретические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения: Материалы международной конференции. – 20-21 октября 2016 г. – г. Екатеринбург. – С. 21–23.
5. Бирюкова Е.В. Современный взгляд на роль селена в физиологии и патологии щитовидной железы // Эффективная фармакотерапия. Эндокринология. – 2017. – №1. – С. 34–41.
6. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биомембранах. / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков // М.: Наука, 2003. – С. 230 - 272.
7. Генотоксический эффект воздействия некоторых элементных или элементнооксидных наночастиц и его ослабление комплексом биопротекторов. / М.П. Сутункова, О.Г. Макеев, Л.И. Привалова [и др.]// Медицина труда и промышленная экология. – 2018. – № 11. – С.10–16.
8. Гмошинский, И.В. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности / И.В. Гмошинский, В.К. Мазо, В.А. Тутельян, С.А. Хотимченко // Экология моря – 2000. – Т.54. – С.5-19.

9. Гонохова, М.Н. Сравнительная цитоморфологическая характеристика селезенки крыс при воздействии пестицидов / М.Н. Гонохова, Т.В. Бойко, А.А. Ельцова // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 1056-1056.
10. ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании гарант // Электронный фонд актуальных правовых и нормативно-технических документов «Консорциум Кодекс». – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200089432> (дата обращения 09.04.2022)
11. Государственный реестр лекарственных средств. – М.: Медицинский совет, 2009. – 560 с.
12. Грехова Т.Д. Оценка эффективности глутаминовой кислоты как средства коррекции ранних проявлений профессионального флюороза. / Т.Д. Грехова Л.К. Конышева, О.М. Бабакова // Медицина труда и пром. экология. – 1994. – № 8. – С. 20-23.
13. Досынбаева, Г.Н. Цитоморфологическая оценка бронхоальвеолярного лаважа, печени и желудка при воздействии хлопковой пыли, содержащей фосфоорганические пестициды в эксперименте / Г.Н. Досынбаева // World science. – 2016. – Т. 5(9), №3. – С. 22–30.
14. Ильясов И.Р. Исследование антирадикальной активности композиции на базе диквертина: дис. канд. фарм. наук: 15.00.02. – М., 2009. – 148 с.
15. Использование биологически активных веществ в профилактике токсического действия некоторых тяжелых металлов. / Т.Д. Дегтярева, Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2001. – №5. – С.71–73.
16. Исследование белковой короны оксида графена, модифицированного полиэтиленгликолем. / Бочкова М. С., Храмцов П.В., Заморина С.А. [и др.] // Сборник тезисов Международной научно-практической конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии». –18-21 ноября 2020

года, г. Екатеринбург. – URL: <https://orgchembiotech2020.urfu.ru/ru/sessija-ehlektronnykh-posterov/> (дата обращения 08.09.2021)

17. Кацнельсон, Б.А. Пневмокониозы: патогенез и биологическая профилактика / Б.А. Кацнельсон, О.Г. Алексеева, Л.И. Привалова, Е.В. Ползик // Екатеринбург. 1995 – 325 с.

18. Киселева, Е.П., Полевщиков, А.В. Метод автоматизированного учета НСТ-теста. / Е.П. Киселева, А.В. Полевщиков //Клин. лаб. диагн. – 1994. – №4. – С.27–29.

19. Кислицина, Н.С. Перекисное окисление липидов как один из механизмов патогенеза силикоза (экспериментальное исследование): Дисс. канд. биол. наук: – Свердловск, 1986. –190 с.

20. Кошелева, И.И. Особенности структурно-клеточных преобразований лимфатического региона подвздошной кишки в зависимости от способа введения токсической дозы селенита натрия / И.И. Кошелева // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. XVIII, № 2. – С. 256–285.

21. Кругликов, Г.Г. Особенности функциональной морфологии клеток на отпечатках органов, пленочных препаратах соединительной ткани и мазках крови / Г.Г. Кругликов, В.Б. Суслов, Л.М. Лихачева [и др.] // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2014. –№ 4. – С. 86–92.

22. Кульчицкий, Н.А. Современные оптоэлектронные приборы на основе селенида цинка. / Н.А. Кульчицкий, А.В. Наумов //Наноинженерия. – 2014. –№ 1. – С. 19–27.

23. Лебедев К.А. Иммунограмма в клинической практике: Введение в прикладную иммунологию. / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина // М.: Наука, 1990. – 233 с.

24. Лебедь, А. Б. Производство селена и теллура на ОАО «Уралэлектромедь»: учебное пособие. / А. Б. Лебедь, С. С. Набойченко, В. А. Шунин // Под общ. ред. С. С. Набойченко. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2015

25. Мадарь И.И. Гидрометаллургическое извлечение селена из продуктов экстракционной переработки промывной кислоты медного производства. Автореф. дисс. канд. тех наук. 05.16.02 – СПб. 2015. – 120 с.
26. Масликова, В.Г. Роль селена и его соединений в терапии цереброваскулярных заболеваний /Г.В. Масликова, М.Н. Ивашев // Биомедицина. – 2010. – № 3. – С. 94– 96
27. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
28. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования: Минздрав СССР. – Кишинев, 1980. – 47 с.
29. Минигалиева, И.А. Некоторые закономерности комбинированной токсичности металлооксидных наночастиц. / И.А. Минигалиева // Токсикологический вестник. – 2016. – №6(141). – С.18 – 24.
30. Мирогов Ю.В., Яснецов В.С. Влияние перидоксина, рибофлавина, калия оротата, фолиевой и глутаминовой кислоты на восстановление работоспособности у неполовозрелых крыс // Фармакол. и токсикол. – 1985. - № 4. – С. 110 – 112.
31. Морозова, Л.В. Химические элементы в организме человека: справочные материалы / под общ. ред. Л.В. Морозовой. – Архангельск: Поморский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 2001. – 47 с.
32. МР 2.3.1.0253—21 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации
33. Нарциссов, Р.П. Применение п-нитротетразоли фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека / Р.П. Нарциссов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1969. – №5. – С. 85 – 91.
34. О соотношении между общепринятой практикой оценки риска для здоровья при полиметаллических экспозициях и теорией комбинированной

токсичности / Минигалиева И.А., Кацнельсон Б.А., Гурвич В.Б. [и др.] // Токсикологический вестник. – 2017. – № 4. – С. – 13 – 18.

35. Орлов, А.И. Прикладная статистика. – 2004. – М.: Издательство «Экзамен». – 576 с.

36. Основные результаты токсикологических экспериментов «ин виво» с некоторыми металлическими и металло-оксидными наночастицами. / Б.А. Кацнельсон, Л.И. Привалова, М.П. Сутункова [и др.] // Токсикологический Вестник. – 2015. – №3. – С. 26–39.

37. О смысле понятия «гормезис» и его месте в общей теории зависимости ответа организма на потенциально вредное воздействие от его силы / В.Г. Панов, И.А. Минигалиева, Т.В. Бушуева [и др.] // Токсикологический Вестник. – 2020. – № 5. – С. 2-9.

38. Оценка комбинированной и сравнительной токсичности наночастиц оксида цинка и оксида меди в эксперименте *in vivo* / И.А. Минигалиева, М.П. Сутункова, Б.А. Кацнельсон[и др.] // Здоровье населения и среда обитания - ЗНиСО. – 2021. – № 6. – С. 34-40.

39. Патент РФ 2 438 666 С1 от 14.04.2010. Селенсодержащий препарат для профилактики и лечения микроэлементоза у сельскохозяйственных животных и птиц. / А.В. Серов, А.В. Оробец, В.П. Тимченко, Н.П. Оботудова // Google Patents – URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/68/03/e1/763d8149d366f8/RU2438666C1.pdf> (дата обращения 09.07.2021).

40. Патент РФ 2 514 670 С1 от 08.11.2012. Способ повышения продуктивности цыплят-бройлеров. В. А. Оробец, А. В. Серов, В. А. Беляев [и др.] // Яндекс Патенты – URL: [https://patents.s3.yandex.net/RU2514670C1\\_20140427.pdf](https://patents.s3.yandex.net/RU2514670C1_20140427.pdf) (дата обращения 09.07.2021).

41. Патент РФ № 2392944 от 27.06.2010. Препарат для лечения и профилактики нарушения обмена селена для сельскохозяйственных животных / В. А. Оробец, А.В. Серов, В.А. Беляев [и др.] // Патентный поиск РФ – URL: <https://www.freepatent.ru/patents/2392944> (дата обращения 09.07.2021).

42. Перова, Н. В. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в кардиологии / Н.В. Перова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2005. – Т. 4. – №. 4. – С. 101– 107.

43. Повышение резистентности организма к вредному действию металлосодержащих наночастиц как перспективный подход к управлению рисками для здоровья / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, М.П. Сутункова [и др.] // Медицина труда и промышленная экология. – 2016. – № 10. – С. 29–32.

44. Полубояринов, П.А. Метаболизм и механизм токсичности селеносодержащих препаратов, используемых для коррекции дефицита микроэлемента селена / П.А. Полубояринов, Д.Г. Елистратов, В.И. Швец // Тонкие химические технологии. – 2019. – Т. 14. – № 1. – С. 5–24.

45. Роль окислительного стресса в патофизиологии кардиоваскулярной патологии / И.В. Демко, Е.А. Собко, И.А. Соловьева [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2022. – Т.15, №1. – С.107–117.

46. Рузаков, В.О. Исследование состава аэрозолей в воздухе рабочей зоны на различных этапах переработки меди / В.О. Рузаков // В сборнике: Материалы 16-го Российского Национального Конгресса с международным участием «Профессия и здоровье». – 2021. – С. 437–440.

47. Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии. / В.В. Вапиров, М.Э. Шубина, Н.В. Вапирова [и др.] // – Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. – 68 с.

48. Сперанский, С.В. Определение суммационно-порогового показателя (СПП) при различных формах токсикологического эксперимента: Метод. Рекомендации / М-во здравоохранения РСФСР. Гл. упр. НИИ и координации науч. исслед., Новосиб. н.-и. сан. ин-т.; Сост. Сперанский С.В. — Новосибирск, 1975. — 27 с.

49. Сутункова М.П. Обоснование критериев токсиколого-гигиенической оценки и методов управления риском для здоровья, создаваемым металлосодержащими наночастицами. Дисс. докт. мед. наук. 14.02.01 – Пермь, 2019. – 317 с.

50. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров // Пушино: Synchronobook. – 2013. – 310 с.

51. Третьяк, Л.Н. Специфика влияния селена на организм человека и животных (применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания) / Л.Н. Третьяк, Е.М. Герасимов // Вестник ОГУ. – 2007. – № 12. – С.136–144

52. Фолманис, Г.Э. Синтез и характеристики наночастиц селена, предназначенных для обогащения проростков редиса. / Г.Э. Фолманис, М.А. Федотов, Н.А. Голубкина, А.В. Солдатенко // Российские нанотехнологии. – 2018. – № 9. – С. 65–69.

53. Цитологические и биохимические особенности жидкости, получаемой при бронхоальвеолярном лаваже у крыс после интратрахеального введения наноразмерных меднооксидных частиц / Л.И. Привалова, Б.А. Кацнельсон, Н.В. Логинова [и др.] // Токсикологический вестник. – 2014. – Т.5. – С. 8-15.

54. Юркова, И. Н. Влияние наночастиц селена и селенита натрия на рост и развитие растений пшеницы. / И. Н. Юркова, А.В. Омельченко // Ученые записки Крымского Федерального Университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2015. – № 3. – С. 96–106.

55. 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 / M.P. Sutunkova, S.N. Solovyeva, B.A. Katsnelson [et al.] // Toxicology. – 2017. – Vol. 384. – Pp. 59–68. – doi: 10.1016/j.tox.2017.04.010.

56. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats / K. Loeschner, N. Hadrup, M. Hansen [et al.] // Metallomics. – 2014. – Vol. 6, № 2. – Pp. 330-337. – doi: 10.1039/c3mt00309d.

57. Ackrell, B.A.C. Structure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase / B.A.C. Ackrell, M.K. Johnson, R.P. Gunsalus, G. Cecchini // F.

Muller (ed) Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins Boca Raton, FL: CRC Press. – 1992. – Vol. 3. – Pp. 229–297.

58. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement / J.K. MacFarquhar, D. L. Broussard, P. Melstrom [et al.] // Arch Intern Med. – 2010. – Vol. 170, № 3. – Pp. 256–261. – doi: 10.1001/archinternmed.2009.495

59. Anticancer activity of selenium nanoparticles in vitro studies / F. Martínez-Esquivias, M. Gutiérrez-Angulo, A. Pérez-Larios [et al.] // Anticancer Agents. Med. Chem. – 2022. — Vol.22, № 9. – Pp. 1658-1673. – doi: 10.2174/1871520621666210910084216.

60. Anti-leukemia activities of selenium nanoparticles embedded in nanotube consisted of triple-helix  $\beta$ -D-Glucan / Y. Jin, L. Cai, Q. Yang [et al.] // Carbohydr Polym. – 2020. – Vol. 240. – Pii. 116329. – doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116329.

61. Anti-Oxidant and Anti-Endothelial Dysfunctional Properties of Nano-Selenium in vitro and in vivo of Hyperhomocysteinemic Rats / Z. Zheng, L. Liu, K. [et al.] // Int J Nanomedicine. – 2020. –Vol. 15. – Pp. 4501-4521. – doi: 10.2147/IJN.S255392.

62. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan / X. Zhai, C. Zhang, G. Zhao, et al. // Journal of Nanobiotechnology. – 2017. – Vol. 15. – Pii. 4.

63. Anti-silikotische Wirkung von Glutamat / B.A. Katsnelson, K.I. Morosova, B.T. Velichkovski [et al.] // Arbeitsmed. Sozialmed. Praventivmed. – 1984. – Vol. 19, № 7, – Pp. 153-156.

64. Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid / N. Maeda, H. Hagihara, Y. Nakata [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. –2000. – Vol.97, № 2. – Pp.841–846.

65. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal / K. Lauber, E. Bohn, S.M. Kröber [et al.] // Cell. – 2003. – Vol.113, № 6. – Pp.717-730. – doi: 10.1016/S0092-8674(03)00422-7.

66. Are in vivo and in vitro assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition

of data obtained in some experiments with NiO and Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles / I.A. Minigalieva, T.V. Bushueva, E. Fröhlich [et al] // Food and Chemical Toxicology. – 2017. – Vol. 109, № 1. – Pp. 393–404. – doi: 10.1016/j.fct.2017.09.032.

67. Arifin, S.A., Lysophosphatidylinositol Signalling and Metabolic Diseases. / S.A. Arifin, M. Falasca // Metabolites.– 2016. – Vol. 6, № 1. – Pp. 6. – doi: 10.3390/metabo6010006.

68. Autophagy is an important action mode for functionalized selenium nanoparticles to exhibit anti-colorectal cancer activity / G. Huang, Z. Liu, L. He [et al.] // Biomater Sci. – 2018. – Vol. 6, № 9. – Pp. 2508-2517. – doi: 10.1039/c8bm00670a.

69. Avery, J.C. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. / J.C. Avery, P.R. Hoffmann. // Nutrients. – 2018. – Vol. 10(9). – Pii: E1203. doi: 10.3390/nu10091203.

70. Baltaci, A.K. Review - Selenium - Its metabolism and relation to exercise. / A.K. Baltaci, R. Mogulkoc, M. Akil, M. Bicer // Pak J Pharm Sci. – 2016. –Vol. 29(5). – Pp. 1719–1725.

71. Biogenic selenium nanoparticles (SeNPs) from citrus fruit have anti-bacterial activities. / G.B. Alvi, M.S. Iqbal, M.M.S. Ghaith [et al.] // Qadir. Sci. Rep. – 2021. – Vol. 11(1). – Pii. 4811. – doi: 10.1038/s41598-021-84099-8.

72. Biological functions of selenium and its potential influence on Parkinson's disease. / J.H. Ellwanger, S.I. Franke, D.L. Bordin [et al.] //An Acad Bras Cienc. – 2016. – Vol. 88. – Pp.1655-1674. – doi: 10.1590/0001-3765201620150595.

73. Blanchard, C. Biology of the Eosinophil. / C. Blanchard, M.E. Rothenberg //Advances in Immunology. – 2009. –Vol. 101. –Pp. 81–121. – doi: 10.1016/S0065-2776(08)01003-1.

74. Borowska, M. Investigation of interaction between biogenic selenium nanoparticles and human serum albumin using microwave plasma optical emission spectrometry operating in a single-particle mode. / M. Borowska, E. Pawlik, K. Jankowski // Monatsh Chem. – 2020. – Vol. 151. –Pp. 1283–1290. – doi: 10.1007/s00706-020-02663-w.

75. Calder, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? / P.C. Calder // *Br J Clin Pharmacol.* – 2013. – Vol. 753. – Pp. 645–662. – doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x.
76. Calvillo-Robledo, A. The oncogenic lysophosphatidylinositol (LPI)/GPR55 signaling / A. Calvillo-Robledo, R.D. Cervantes-Villagrana, P. Morales, B.A. Marichal-Cancino // *Life Sciences.* – 2022. – Vol. 301. – Pii.120596. – doi: 10.1016/j.lfs.2022.120596.
77. Carnitine palmitoyltransferase 2 and carnitine/acylcarnitine translocase are involved in the mitochondrial synthesis and export of acylcarnitines / S. Violante, L. Ijlst, H.T. Brinke [et al.] // *FASEB J.* – 2013. – Vol.27, № 5. – Pp. 2039–2044. – doi: 10.1096/fj.12-216689.
78. Carr, A.C. Vitamin C and Immune Function. / A.C. Carr, S. Maggini // *Nutrients.* – 2017. – Vol. 911. – Pii.1211. – doi: 10.3390/nu9111211.
79. Changes in blood pressure associated with lead, manganese, and selenium in a Bangladeshi cohort / Bulka C.M., Scannell B. M., Persky V.W. [et al.] // *Environ Pollut.* – 2019. – Vol. 248. – Pp. 28–35. – doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.129.
80. Chen, Y. Toxicity of selenium nanoparticles on *Poteroiochromonas malhamensis* algae in Waris-H culture medium and Lake Geneva water: Effect of nanoparticle coating, dissolution, and aggregation. / Y. Chen, W. Liu, X. Leng, S. Stoll // *Sci Total Environ.* – 2022. – Vol. 20; – Pii. 808:152010. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152010.
81. Chen, Y.S. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles / Y.S. Chen, Y.C. Hung, I. Liao, G.S. Huang // *Nanoscale Res Lett.* – 2009. – Vol. 4 (8). – Pp. 858-864. – doi: 10.1007/s11671-009-9334-6.
82. Cobalt oxide nanoparticles induce oxidative stress and alter electromechanical function in rat ventricular myocytes / M. Savi, L. Bocchi, F. Cacciani [et al.] // *Part Fibre Toxicol.* – 2021. – Vol. 18. – Pii. 1. doi: 10.1186/s12989-020-00396-6
83. Combined subchronic toxicity of aluminum (III), titanium (IV) and silicon (IV) oxide nanoparticles and its alleviation with a complex of bioprotectors / I.A.

Minigalieva, B.A. Katsnelson, L.I. Privalova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 3. – Pii. 837. – doi: 10.3390/ijms19030837

84. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice / L. Yang, H. Kuang, W. Zhang [et al.] // *Sci.Rep.* – 2017. – Vol.7. – Pii. 3303. –doi: 10.1038/s41598-017-03015-1.

85. Copper Nanoparticles Induce Oxidative Stress via the Heme Oxygenase 1 Signaling Pathway in vitro Studies / L. Zou, G. Cheng, C. Xu [et al.] // *Int J Nanomedicine.* – 2021. – Vol. 16. – Pp.1565-1573. – doi: 10.2147/IJN.S292319.

86. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis / M. G. Sun, J. Williams, C. Munoz-Pinedo [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 9. – Pp. 1057-1065. – doi: 10.1038/ncb1630.

87. Cortical Structural Connectivity Alterations and Potential Pathogenesis in Mid-Stage Sporadic Parkinson's Disease / X. Deng, Z. Liu, Q. Kang [et al.]// *Frontiers in aging neuroscience.* – 2021. – Vol. 13. – Pii. 650371. – doi: 10.3389/fnagi.2021.650371

88. Cross-sectional Study: Relationship Between Serum Selenium and Hypertension in the Shandong Province of China / G. Wu, Z. Li, W. Ju [et al.] // *Biol Trace Elem Res.* – 2018. – Vol. 185, № 2. – Pp. 295-301. – doi: 10.1007/s12011-018-1272-7

89. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells / A. Katsumiti, A.J. Thorley, I. Arostegui [et al.] // *Toxicology in Vitro.* – 2018. – Vol. 1, № 48. – Pp. 146-155.

90. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles / F. Gao, Q. Yuan, L. Gao [et al.] // *Biomaterials.* – 2014. – Vol.35, № 31. – Pp. 8854–8866. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.004.

91. Darnell, J. C. Synthesis of phosphatidylinositol in rat liver microsomes is accompanied by the rapid formation of lysophosphatidylinositol / J. C. Darnell, D. G. Osterman, A. R. Saltiel // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* – 1991. – Vol. 1084. – Pp. 269–278. – doi: 10.1016/0005-2760(91)90069-t.

92. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties / A. Sukhanova, S. Bozrova, P. Sokolov [et al.] // *Nanoscale Res Lett.* – 2018. – Vol.13(1). – Pii.44. – doi: 10.1186/s11671-018-2457-x.
93. Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position rs2735940 in the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene by the Introduction of a New Restriction Enzyme Site for the PCR-RFLP Assay / S. Wang, M. Ding, X. Duan, T. Wang [et al.] // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2017. – Vol. 47.– Pp. 546-550.
94. Development of Treatment and Prophylactic Means with Selenium Nanoparticles on the Basis of Mineral Water of the Krasnoarmeysk Source for Application in Balneology / M. Nastueva, D.Kompantsev, G. Sagradyan [et al.] // *Advances in Biological Sciences Research ISILS.* – 2019. – Vol.7. – Pp. 212–214. – doi: 10.2991/isils-19.2019.52
95. Differential distribution and association of FTO rs9939609 gene polymorphism with obesity: A cross-sectional study among two tribal populations of India with East-Asian ancestry / S.S. Ningombam, V. Chhungi, M.K. Newmei [et al.] // *Gene.* – 2018. – Vol. 647. – P. 198-204.
96. Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs / W.S. Cho, R. Duffin, C.A. Poland [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2012. – Vol. 6, № 1. – Pp. 22-35. – doi: 10.3109/17435390.2011.552810.
97. Durán, N. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. / N. Durán, C.P. Silveira, M. Durán, D.S. Martinez // *J. Nanobiotechnol.* – 2015. – Vol.13. – Pii. 55. –doi: 10.1186/s12951-015-0114-4
98. Effect of high dose of selenium nanoparticles on alimentary tract in rodents / S. Khubulava, N. Chichiveishvili, N. Shavshishvili [et al.] // *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology.* – 2019. – Vol. 10, № 2. – Pii. 531 – doi: 10.35248/2157-7439.19.10.531.
99. Effect of vitamin D supplementation on inflammation: protocol for a systematic review / A. Mousa, M. Misso, H. Teede [et al.] // *BMJ Open.* – 2016. – Vol.64. – Pii. e010804. – doi: 10.1136/bmjopen-2015-010804.

100. Effects of 14-day oral low dose selenium nanoparticles and selenite in rat as determined by metabolite pattern determination / N. Hadrup, K. Loeschner, K. Skov [et al.] // PeerJ. – 2016. – Vol. 4. – Pii. e2601. – doi: 10.7717/peerj.2601
101. Effects of Sub-Lethal Doses of Selenium Nanoparticles on the Health Status of Rats / L. Urbankova, S. Skalickova, M. Pribilova [et al.] // Toxics. – 2021. – Vol. 9, №2. – Pii. 28. – doi: 10.3390/toxics9020028.
102. Ellman, G. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups Text. / G. A. Ellman, H. Lysko // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 93. – P. 98-102.
103. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity in vivo / B. A. Katsnelson, L.I. Privalova, M. P. Sutunkova [et al.] // Bioactivity of Engineered Nanoparticles. – 2017. – Pp.259–319. – doi: 10.1007/978-981-10-5864-6\_11
104. Fahmy, B. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells / B. Fahmy, S. A. Cormier // Toxicol In Vitro. – 2009. – Vol. 237. – Pp.1365-1371. – doi: 10.1016/j.tiv.2009.08.005.
105. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells / C. Sakai, M. Ishida, H. Ohba [et al.] // PloS one. – 2017. – Vol. 12, № 11. – Pii. e0187934. – doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187934>
106. Gad, M.A. Selenium toxicosis assessment *in vivo* and *in vitro*) and the protective role of vitamin B12 in male quail *Coturnix Coturnix*) / M.A. Gad, S.M. Abd El-Twab // Environ. Toxicol. Pharmacol. – 2009. – Vol.271. – Pp.7–16. – doi: 10.1016/j.etap.2008.07.001.
107. Green synthesis of selenium nanoparticles using *Acinetobacter* sp. SW30: optimization, characterization and its anticancer activity in breast cancer cells / S.A. Wadhvani, M. Gorain, P. Banerjee [et al.] // Int J Nanomedicine. – 2017. – Vol.12. – Pp. 6841–6855. – doi: 10.2147/IJN.S139212.
108. High dietary selenium intake alters lipid metabolism and protein synthesis in liver and muscle of pigs / Z. Zhao, M. Barcus, J. Kim [et al.] // J Nutr. – 2016. – Vol. 146, № 9. – Pp., 1625–1633. – doi: 10.3945/jn.116.229955.

109. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes undersub-toxic conditions / M. Cuillel, M. Chevallet, P. Charbonnier [et al.] // *Nanoscale*. – 2014. – Vol.16 (3). – P. 1707–15.

110. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: a comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. / P. Cronholm, H.L. Karlsson, J. Hedberg [et al.]// *Small*. – 2013. – Vol. 9(7). –P. 970-982. – doi: 10.1002/smll.201201069.

111. Jafari Dehkordi, A. Evaluation of nanoselenium (Nano-Se) effect on hematological and serum biochemical parameters of rat in experimentally lead poisoning. / A. Jafari Dehkordi, A.N. Mohebbi, M.R. Aslani, S.M. Ghoreyshi. // *Human & Experimental Toxicology*. – 2016. – Vol.36, № 4. – Pp. 421-427. – doi: 10.1177/0960327116651124.

112. Jia, X. Subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats / X. Jia, N. Li, J. A. Chen // *Life Sci*. – 2005. – Vol.76, № 17. – Pp. 1989–2003. – doi: 10.1016/j.lfs.2004.09.026.

113. Jia, X. The potential liver, brain, and embryo toxicity of titanium dioxide nanoparticles on mice / X. Jia, S. Wang, L. Zhou, L. Sun // *Nanoscale research letters*. – 2017. – Vol.12, № 1. – Pii. 478. – doi: 10.1186/s11671-017-2242-2

114. Johnson, K.A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013 // *FEBS Letters*. –2013. – Vol. 587. – Pp. 2753-2766. – doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.012

115. Joles, J.A. Endothelial function in proteinuric renal disease / J.A. Joles, E.S.G. Stroes, T.J. Rabelink // *Kidney International*. – 1999. – Vol. 56. – Pp. S57-S61. – doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.07115.x.

116. Kennedy, I.M. Uptake and inflammatory effects of nanoparticles in a human vascular endothelial cell line / I.M. Kennedy, D. Wilson, A.I. Barakat // *Research Report*. – 2009. – Vol. 136. –Pp. 3–32.

117. Kiełczykowska, M. Selenium - a fascinating antioxidant of protective properties / M. Kiełczykowska, J. Kocot, M. Paździor, I. Musik // *Adv. Clin. Exp. Med*. – 2018. – Vol. 27, №2. – Pp. 245–255.

118. Koekkoek, W.A. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness / W.A. Koekkoek, A. R. van Zanten // *Nutr Clin Pract.* – 2016. – Vol. 314. – Pp. 457-474. – doi: 10.1177/0884533616653832.
119. Kondaparthi, P. Selenium nanoparticles: An insight on its Pro-oxidant and antioxidant properties / P. Kondaparthi, S.J.S. Flora, S. Naqvi // *Front. Nanosci. Nanotech.* – 2019. – Vol. 6. – Pp. 1–5. – doi: 10.15761/FNN.1000189
120. Kong, E.Y. Biphasic and triphasic dose responses in zebrafish embryos to low-dose 150 kV X-rays with different levels of hardness / E.Y. Kong, S.H. Cheng, K.N. Yu // *J. Radiat. Res.* – 2016. – Vol. 57. – Pp. 363–369. – doi: 10.1093/jrr/rrw026
121. Kumar, N. Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish / N. Kumar, K.K. Krishnani, N.P. Singh // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2018. – Vol. 25. – Pp. 8914–8927. – doi: 10.1007/s11356-017-1165-x.
122. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression / A. Canbay, A.E. Feldstein, H. Higuchi, N. Werneburg [et al.] // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 38. – Pp. 1188-1211.
123. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats / Ch. Liu, Q. Tao, M. Sun [et al.] // *Laboratory Invest.* – 2010. – Vol. 90. – Pp. 1805–1816.
124. Lee, J. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1 / J. Lee, M.M. Pena, Y. Nose, D.J. Thiele // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2002. – Vol. 277, № 6. – Pp. 4380-4387.
125. Lesnichaya, M. Synthesis and comparative assessment of antiradical activity, toxicity, and biodistribution of  $\kappa$ -carrageenan-capped selenium nanoparticles of different size: in vivo and in vitro study / M. Lesnichaya, R. Shendrik, E. Titov, B. Sukhov // *IET nanobiotechnology.* – 2020. – Vol. 14, № 6. – Pp. 519–526. – doi: 10.1049/iet-nbt.2020.0023
126. Levin, A. Vitamin D and its analogues: do they protect against cardiovascular disease in patients with kidney disease? / A. Levin, Y.C. Li // *Kidney Int.* – 2005. – Vol.68, № 5. – Pp. 1973-1981.

127. Liao, C. The intricate role of selenium and selenoproteins in erythropoiesis / C. Liao, B.A. Carlson, R.F. Paulson, K.S. Prabhu // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 127. – Pp. 165-171. – doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.578.
128. Long-term selenium exposure / C.J. Diskin, C.L. Tomasso, J.C. Alper [et al] // *Arch. Intern. Med.* – 1979. – Vol. 139. – Pp. 824–826.
129. Loveland, S. Robustness of the t-test for violations of normality. – 2004. – URL: <https://studylib.net/doc/7012116/robustness-of-the-t-test-for-violations-of-normality> (дата обращения 04.04.2022).
130. Low dietary selenium induce increased apoptotic thymic cells and alter peripheral blood T cell subsets in chicken / X., Peng H.M. Cui, J. Deng [et al.] // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2011. – Vol. 142, № 2. – Pp. 167-73. – doi: 10.1007/s12011-010-8756-4.
131. Lubos, E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities / E. Lubos, J. Loscalzo, D.E. Handy // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – Vol.15, № 7. – Pp.1957-1997. – doi: 10.1089/ars.2010.3586.
132. Lumley, T. The importance of the normality assumption in large public health data sets / T. Lumley, P. Diehr, S. Emerson, L. Chen // *Annu. Rev. Public Health.* – 2002. – Vol. 23. – Pp. 151–169. – doi: 10.1146/annurev.publhealth.23.100901.140546.
133. Lysophosphatidylcholine perpetuates macrophage polarization toward classically activated phenotype in inflammation. / X. Qin, C. Qiu, L. Zhao [et al.] // *Cellular Immunology.* – 2014. – Vol. 289. – Pp. 185-190. – doi: 10.1016/j.cellimm.2014.04.010.35
134. Lysophosphatidylethanolamine affects lipid accumulation and metabolism in a human liver-derived cell line / Y. Yamamoto, T. Sakurai, Z. Chen [et al.] // *Nutrients.* – 2022. – Vol.14, № 3. – Pii.579. – doi: 10.3390/nu14030579.
135. Manifestation of systemic toxicity in rats after a short-time inhalation of lead oxide nanoparticles / M.P. Sutunkova, S.N. Solovyeva, I.N. Chernyshov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – Pii. 690. – doi:10.3390/ijms21030690.

136. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species / P.P. Fu, Q. Xia, H.M. Hwang [et al] // *J. Food. Drug. Anal.* – 2014. – Vol.22, № 1. – Pp.64–75. – doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.005.
137. Mezes, M. Prooxidant mechanisms of selenium toxicity / M. Mezes, K. Balogh // *Acta Biol. Szeged.* – 2009. – Vol. 53. – P. 15–18.
138. Mistry, H.D. Selenium in reproductive health / H.D. Mistry, F. Broughton Pipkin, C.W. Redman, L. Poston // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 206, № 1. – Pp. 21–31. – doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.034.
139. Mitochondrion-targeted selenium nanoparticles enhance reactive oxygen species-mediated cell death / Y. Zhuang, L. Li, L. Feng [et al.] // *Nanoscale.* – 2020. – Vol.12. – Pp. 1389–1396.
140. Naderi, M. Proteomic analysis of liver tissue from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high rearing density after administration of dietary vitamin E and selenium nanoparticles / M. Naderi, S. Keyvanshokoo, A.P. Salati, A. Ghaedi // *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* – 2017. – Vol. 22. – Pp.10-19. – doi: 10.1016/j.cbd.2017.02.001.
141. Naked selenium nanoparticles for antibacterial and anticancer treatments / L.D. Geoffrion, T. Hesabizadeh, D. Medina-Cruz [et al.] // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5, № 6. – Pp. 2660-2669. – doi: 10.1021/acsomega.9b03172.
142. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination / Y.N. Zhang, W. Poon, A. J. Tavares [et al.] // *J. of Controlled Release.* – 2016. – Vol. 240. – Pp. 332-348. – doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.020.
143. Nanoparticles of selenium as high bioavailable and non-toxic supplement alternatives for broiler chickens / S. Gangadoo, I. Dinev, N.L. Willson [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2020. – Vol. 27(14). Pp – 16159-16166. – doi: 10.1007/s11356-020-07962-7.
144. Nanoselenium transformation and inhibition of cadmium accumulation by regulating the lignin biosynthetic pathway and plant hormone signal transduction in pepper plants / Li D., Zhou C., Ma J. [et al.] // *J Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19. – Pii. 316. – doi: 10.1186/s12951-021-01061-6.

145. Nasirpour, M. Effects of nano-selenium on the liver antioxidant enzyme activity and immunoglobolins in male rats exposed to oxidative stress / M. Nasirpour, A.A. Sadeghi, M. Chamani // *J. Livestock Sci.* – 2017. – Vol. 8. – Pp. 81-87
146. Nelson, A.J. Altered somatosensory processing in Parkinson's disease and modulation by dopaminergic medications / A.J. Nelson, T. Hoque, C. Gunraj, R. Chen // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2018. – Vol. 53. – Pp.76–81. – doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.05.002.
147. Novel lysophospholipid receptors: their structure and function / K. Makide, A. Uwamizu, Y. Shinjo [et al.] // *Journal of Lipid Research.* – 2014. – Vol.55, № 10. – Pp.1986-1995. – doi: 10.1194/jlr.R046920.
148. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition*, 1995. – 192 p.
149. Nuttall, K. L. Evaluating selenium poisoning. / K.L. Nuttall // *Ann. Clin. Lab. Sci. Autumn.* – 2006. – Vol. 36. – Pp. 409–420.
150. Oguntibeju, O.O. Selenium: its potential role in male infertility / O.O. Oguntibeju; J.S. Esterhuyse, E.J. Truter // *Pak. J. Med. Sci.* 2009. – Vol. 25, № 2. – Pp. 332–337.
151. On the interactions of free radicals with gold nanoparticles / Z. Zhang, A. Berg, H. Levanon [et al.] // *Journal of the American Chemical Society.* – 2003. – Vol. 125, № 26. – Pp. 7959–7963.
152. Organism's responses to a long-term inhalation of silicacontaining submicron particles of an industrial aerosol / S. N. Solovyeva, B. A. Katsnelson, M. P. Sutunkova [et al.] // *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 699. –2019. – Pii. 012054. – doi: 10.1088/1757-899X/699/1/012054.
153. Paciorek, P. Products of lipid peroxidation as a factor in the toxic effect of silver nanoparticles / P. Paciorek, M. Żuberek, A. Grzelak // *Materials (Basel).* – 2020. – Vol. 13. –Pii. 2460. – doi: 10.3390/ma13112460.
154. Palace, V.P. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease / V.P. Palace, N. Khaper, Q. Qin, P.K. Singal // *Free Radic. Biol. Med.* –1999. –Vol. 26, № 5–6. – Pp. 746–761.

155. Pathophysiology of somatosensory abnormalities in Parkinson disease. / A. Conte, N. Khan, G. Defazio [et al.] // *Nat Rev Neurol.* – 2013. – Vol. 9, № 12. – Pp. 687-697. – doi: 10.1038/nrneurol.2013.224.
156. Pereira, T.C. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model / T.C. Pereira, M.M. Campos, M.R. Bogo // *J.Appl. Toxicol.* – 2016. – Vol. 367. – Pp. 876–85. – doi: 10.1002/jat.3303.
157. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification / S. Jono, M.D. McKee, C. E. Murry [et al.] // *Circ Res.* – 2000. – Vol. 87, № 7. – Pp. 7–10. – doi: 10.1161/01.res.87.7.e10
158. Pieczyńska, J. The role of selenium in human conception and pregnancy/ J. Pieczyńska, H. Grajeta // *J. Trace. Elem. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 29. – Pp. 31–38. – doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.003.
159. Piñeiro, R. Lysophosphatidylinositol signalling: New wine from an old bottle / R. Piñeiro, M. Falasca // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* – 2012. – Vol. 1821, № 4. – Pp.694-705. – doi: 10.1016/j.bbalip.2012.01.009.
160. Poccia, D. Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion / D. Poccia, B. Larijani // *Biochemical Journal.* – 2009. – Vol. 418, № 2. – Pp.233–246. – doi: 10.1042/bj20082105.
161. Privalova, L.I. On the relationship between activation and breakdown of macrophages in the pathogenesis of silicosis (an overview) / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, N.Y. Sharapova, N.S. Kislitsina // *Med. Lav.* – 1995. – Vol. 86, № 6. – Pp. 511–521.
162. Progressive release of mesoporous nano-selenium delivery system for the multi-channel synergistic treatment of alzheimer's disease / J. Sun, C. Wei, Y. Liu [et al.] // *Biomaterials.* – 2019. – Vol.197. – Pp. 417-431. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.12.027.
163. Prooxidant and antimicrobial effects of iron and titanium oxide nanoparticles and thalicarpine / E.L. Pavlova, R.D. Toshkovska, T.E. Doncheva [et al.] // *Arch Microbiol.* – 2020. – Vol. 202. – Pp. 1873–1880. – doi: 10.1007/s00203-020-01902-2.

164. Prophylactic activity of biogenic selenium nanoparticles against chronic *Toxoplasma gondii* infection / A Keyhani, M Shakibaie, H Mahmoudvand [et al.] // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* – 2020. – Vol. 15. – Pp.75–84. – doi: 10.2174/1574891X15666200604115001.

165. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles / M.A. Rezvanfar, A.R. Shahverdi, A. Ahmadi [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2013. – Vol. 266.– Pp. 356-365.

166. Protective effects of selenium and nano-selenium on bisphenol-induced reproductive toxicity in male rats / A.A. Khalaf, W. Ahmed, W.A. Moselhy [et al.] // *Hum Exp Toxicol.* – 2019. – Vol. 38, №4. – Pp. 398–408. – doi: 10.1177/0960327118816134.

167. Reactive oxygen species generation by copper (II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy / C. Angelé-Martínez, K. V. T. Nguyen, F. S. Ameer [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2017. – Vol. 11, N 2. – P.278–288.

168. Relationship between magnitude of body weight effects and exposure duration in mammalian toxicology studies and implications for ecotoxicological risk assessment / M. Wang, A. Guckland, R. Murfitt [et al.] // *Environ Sci Eur.* – 2019. –Vol. 31. – Pii. 38. – doi: 10.1186/s12302-019-0221-1.

169. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles / P. Ruenraroengsak, P. Novak, D. Berhanu [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2012. – Vol. 6, № 1. – Pp. 94–108. – doi: 10.3109/17435390.2011.558643.

170. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, A.B. Osipenko [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 1980. – Vol.35. – Pp. 205–218. – doi: 10.1289/ehp.8035205.

171. Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: a review of past and present evidences / I. H. Qazi, C. Angel, H. Yang [et al.] // *Antioxidants.* 2019. – Vol. 8, № 8. –Pii. 268. – doi: 10.3390/antiox8080268.

172. Scott, M.L. The selenium dilemma / M.L. Scott // *J Nutr.* – 1973. – Vol. 103, № 6. –Pp. 803–810. – doi: 10.1093/jn/103.6.803.

173. See K. A. Accidental death from acute selenium poisoning / K. A. See, P. S. Lavercombe, J. Dillon, R. Ginsberg // *Med J Aust.* – 2006. – Vol. 185, №7. – Pp. 388–389. – doi: 10.5694/j.1326-5377.2006.tb00616.x.

174. Selenium and L-Carnitine Ameliorate Reproductive Toxicity Induced by Cadmium in Male Mice. / W.A. Alharthi, R.Z. Hamza, M.M. Elmahdi [et al.] // *Biol Trace Elem Res.* – 2019. – №. 197. – Pp. 619–627. – doi:10.1007/s12011-019-02016-7.

175. Selenium and maternal blood pressure during childbirth / E.M. Wells, L.R. Goldman, J.M. Jarrett [et al.] // *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* – 2012. – Vol. 22, № 2. – Pp.191–197. – doi: 10.1038/jes.2011.42.

176. Selenium and selenium species in the etiology of Alzheimer's dementia: the potential for bias of the case-control study design / M. Vinceti, B. Michalke, C. Malagoli [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2019. – Vol.53. – Pp. 154–162. – doi: 10.1016/j.jtemb.2019.03.002.

177. Selenium at the redox interface of the genome, metabolome and exposome / J. Fernandes, X. Hu, M. Ryan Smith [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2018. – Vol.127. – Pp. 215-227.– doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.002.

178. Selenium nanoparticles are more efficient than sodium selenite in producing reactive oxygen species and hyper-accumulation of selenium nanoparticles in cancer cells generates potent therapeutic effects / G. Zhao, X. Wu, P. Chen [et al.] *Free Radic Biol Med.* – 2018. – Vol. 126. – Pp.:55-66. –doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.017.

179. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement / S. Skalickova, V. Milosavljevic, K. Cihalova [et al.] // *Nutrition.* – 2017. – Vol. 33. –Pp. 83-90. – doi: 10.1016/j.nut.2016.05.001.

180. Selenium nanoparticles as candidates for antibacterial substitutes and supplements against multidrug-resistant bacteria. / H.W Han, K.D. Patel, J.H. Kwak [et al.] // *Biomolecules.* – 2021. – Vol.11, № 7. – Pii.1028. – doi: 10.3390/biom11071028.

181. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin / J. Pi, F. Yang, H. Jin [et al] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23. – Pp. 6296–6303. – doi: 10.1016/j.bmcl.2013.09.078.

182. Selenoproteins of the Glutathione Peroxidase Family. / L. Flohé, R. Brigelius-Flohé // *Selenium*. – 2011. – doi: 10.1007/978-1-4614-1025-6\_13.

183. Sestakova, N. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova, A. Puzserova, M. Kluknavsky, I. Bernatova // *Interdiscip Toxicol*. – 2014. – Vol.6, №3. – Pp. 126–135. – doi: 10.2478/intox-2013-0020.

184. Shalini, S. Role of selenium in regulation of spermatogenesis: involvement of activator protein 1 / S. Shalini, M.P. Bansal // *Biofactors*. – 2005. – Vol. 23, №3. – Pp. 151–162. – doi: 10.1002/biof.5520230304.

185. Sharifiyazdi, H. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows/ H. Sharifiyazdi, A. Mirzaei, Z. Ghanaatian // *Anim. Reprod. Sci.* – 2018. – Vol. 188. – Pp. 45–50.

186. Sonkusre, P. Specificity of biogenic selenium nanoparticles for prostate cancer therapy with reduced risk of toxicity: an in vitro and in vivo study. // P. Sonkusre // *Front Oncol*. – 2020. – Vol. 9. – Pii. 1541. doi: 10.3389/fonc.2019.01541

187. Soulsby, J. A simplified method for the quantitative determination of urinary coproporphyrin in lead workers / J. Soulsby, R.L. Smith // *Br J Ind Med*. – 1974. – Vol. 1. – Pp. 72–74. – doi: 10.1136/oem.31.1.72.

188. Spoelstra-de Man, A.M.E. Vitamin C: should we supplement? / A.M.E. Spoelstra-de Man, P.W.G. Elbers, H.M. Oudemans-Van Straaten // *Curr Opin Crit Care*. – 2018. – Vol. 244. – Pp.: 248-255. – doi: 10.1097/MCC.0000000000000510.

189. Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings / A. Selmani, L. Ulm, K. Kasemets [et al.] // *Chemosphere*. – 2020. – Vol. 250. – Pii. 126265. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126265.

190. Steinbrenner, H. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism / H. Steinbrenner, B. Speckmann, A. Pinto, H. Sies // *J Clin Biochem Nutr*. – 2011. – Vol. 48. – Pp. 40–45. – doi: 10.3164/jcbtn.11-002FR.

191. Steinbrenner, H. The role of selenium in type-2 diabetes mellitus and its metabolic comorbidities / H. Steinbrenner, L.H. Duntas, M.P. Rayman // *Redox Biol.* – 2022. – Vol. 50. – Pii. 102236. –doi: 10.1016/j.redox.2022.102236.

192. Su, X. Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetic myocardium: identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics / X. Su, X. Han, D.J. Mancuso, D.R. Abendschein // Gross R.W. // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, №13. – Pp. 5234-5245. – doi: 10.1021/bi047773a.

193. Subacute oral toxicity investigation of selenium nanoparticles and selenite in rats. / N. Hadrup, K. Loeschner, K. Mandrup [et al.] // *Drug Chem Toxicol.* – 2019. – Vol. 42(1). – Pp. 76-83. – doi: 10.1080/01480545.2018.1491589.

194. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles / Y.S. Kim, M.Y. Song, J.D. Park [et al.] // *Part Fibre Toxicol.* – 2010. – Vol. 7. – Pii. 20. – doi: 10.1186/1743-8977-7-20.

195. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors / L.I. Privalova, B.A. Katsnelson, N.V. Loginova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15, № 7. – Pp. 12379–12406. – doi: 10.3390/ijms150712379.

196. Systematic acute and subchronic toxicity evaluation of polysaccharide-protein complex-functionalized selenium nanoparticles with anticancer potency / Z. Zhang, Y. Du, T. Liu [et al.] // *Biomater Sci.* –2019. – Vol. 7, № 12. – Pp. 5112–5123. – doi: 10.1039/c9bm01104h.

197. Tan, S.T. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease / S.T. Tan, T. Ramesh, X.R. Toh, L.N. // *Nguyen Progress in Lipid Research.* – 2020. –Vol. 80. – Pii. 101068. – doi: 10.1016/j.plipres.2020.101068.

198. Testing a set of bioprotectors against the genotoxic effect of a combination of ecotoxicants / B.A. Katsnelson, O.H. Makeev, N.I. Kochneva [et al.] // *CEJOEM.* – 2007. – Vol.13., №.3-4. – Pp. 251-264.

199. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans* / E. Kheradmand, F. Rafii, M.H. Yazdi [et al.] // *Daru*. – 2014. – Vol. 22, №1. – Pii. 48.
200. The association of circulating selenium concentrations with diabetes mellitus / X.L. Liao, Z.H. Wang, X.N. Liang [et al.] // *Diabetes Metab Syndr Obes*. – 2020. – Vol. 13. – Pp. 4755–4761. – doi: 10.2147/DMSO.S284120.
201. The flavonoid quercetin ameliorates liver inflammation and fibrosis by regulating hepatic macrophages activation and polarization in mice / X. Li, Q. Jin, Q. Yao [et al.] // *Front.Pharmacol*. –2018. – Vol. 9. – Pii.72. – doi: 10.3389/fphar.2018.00072.
202. The functions of selenium and selenoproteins relating to the liver diseases / N. Shang, X. Wang, Q. Shu [et al.] // *J Nanosci Nanotechnol*. – 2019. – Vol. 19, №4. – Pp. 1875–1888. – doi: 10.1166/jnn.2019.16287
203. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. / C. Corbo, R. Molinaro, A. Parodi, N. E. Toledano Furman, F. Salvatore, E. Tasciotti // *Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11(1). – Pp. 81–100. – doi: 10.2217/nmm.15.188
204. The L- $\alpha$ -Lysophosphatidylinositol/G Protein-Coupled Receptor 55 System Induces the Development of Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis / M.F. Fondevila, U. Fernandez, M.J. Gonzalez-Rellan [ et al.] // *Hepatology*. – 2021. – Vol.73, № 2. – Pp.606-624. – DOI: 10.1002/hep.31290
205. The most important inferences from the Ekaterinburg nanotoxicology team's animal experiments assessing adverse health effects of metallic and metal oxide nanoparticles / M.P. Sutunkova, L.I. Privalova, I.A. Minigalieva [et al.] // *Toxicology Reports*. – 2018. – Vol. 5. – Pp. 363-376. – doi:10.1016/j.toxrep.2018.03.008.
206. Toxic effects of low-level long-term inhalation exposures of rats to nickel oxide nanoparticles / M. Sutunkova, S. Solovyeva, I. Minigalieva [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol. 20, №7. – Pii. 1778. – doi: 10.3390%2Fijms20071778.
207. Toxicity of selenium nanoparticles in male Sprague-Dawley rats at supranutritional and nonlethal levels / Y. He, S. Chen, Z. Liu [et al.] // *Life Sci*. – 2014. – Vol. 115, № 1-2. – Pp. 44-51. – doi: 10.1016/j.lfs.2014.08.023.

208. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes / X. Zhang, H. Wu, D. Wu [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2010. – Vol. 5. – Pp.771-781. – doi: 10.2147/IJN.S8428.
209. Tzagoloff A. *Mitochondria*. New York, Plenum Press; 1982. – 342 pp.
210. Use of an antiarrhythmic drug against acute selenium toxicity / Y. U. Mercan, Y. Başbuğan, A. Uyar [et al.] // *Trace. Elem. Med.* – 2020. – Vol. 29, № 59. – Pii. 126471. – doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126471.
211. Vinceti, M. Selenium for preventing cancer. / M. Vinceti, T. Filippini, C. Del Giovane [et al.]// *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol.1, № 1. – Pii. CD005195.
212. Vinceti, M. The epidemiology of selenium and human cancer / M. Vinceti, T. Filippini, S. Cilloni, C.M. Crespi // *Adv Cancer Res.* – 2017. – Vol. 136. – Pp. 1–48. – doi: 10.1016/bs.acr.2017.07.001.
213. Vrček, I. V. Selenium Nanoparticles: Biomedical Applications / I. V. Vrček // *Molecular and Integrative Toxicology*. – 2018. – P. 393–412. – doi:10.1007/978-3-319-95390-8\_21.
214. Wang, H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice / H. Wang, J. Zhang, H. Yu // *Free Radic Biol Med.* – 2007. – Vol. 42. – Pp. 1524–1533.
215. Watanbe, T. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice / T. Watanbe, A. Endo // *Mut Res.* – 1991. – Vol. 262. – Pp. 93–99.
216. Webster, T.J. Cytoprotective effects of cerium and selenium nanoparticles on heat-shocked human dermal fibroblasts: An in vitro evaluation. *International Journal of Nanomedicine* / T.J. Webster, AK Roy, Y. Bo // *Int. J. Nanomedicine*. – 2016. – Vol.11. – Pp.1427–1433. – doi: 10.2147/IJN.S104082.
217. Wojtczak, L. Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes / L. Wojtczak // *J Bioenerg Biomembr.* – 1976. – Vol. 8, № 6. – Pp. 293–311. – doi: 10.1007/BF00765158.

218. Wu, T. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs / T. Wu, M. Tang // *J. Appl. Toxicol.* – 2018. – Vol. 38, №1. – Pp. 25-40. – doi: 10.1002/jat.3499.
219. You, L. Prediction of selenoprotein T structure and its response to selenium deficiency in chicken immune organs / L. You, C. Liu, Z. J Yang // *Biol Trace Elem Res.* – 2014. – Vol.160. – Pp. 222–231.
220. Zhang, J. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice / J. Zhang, H. Wang, X. Yan, L. Zhang // *Life Sci.* – 2005. – Vol. 76, № 10. – Pp. 1099–1109. – doi: 10.1016/j.lfs.2004.08.015.
221. Zhang, J. Elemental selenium at nano size (nano-se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with selenomethylselenocysteine in mice / J. Zhang, X. Wang, T. Xu, // *Toxicological Sciences.* – 2008. – Vol. 101, № 1. – Pp. 22–31. – doi: 10.1093/toxsci/kfm221.
222. Zhang, J.S. Biological effects of a nano red elemental selenium / J.S. Zhang, X.Y. Gao, L.D. Zhang, Y.P. Bao // *Biofactors.* – 2001. – Vol. 15, №1. – Pp. 27–38. – doi: 10.1002/biof.5520150103.