

Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Дегтярёва Т.Д., Кузьмин С.В., Гурвич В.Б.,
Сутункова М.П., Киреева Е.П., Минигалиева И.А., Ерёмченко О.С.

Анализ некоторых результатов экспериментального изучения токсикологии наночастиц с позиций гигиенического нормирования

ФБУН «Екатеринбургский медицинский - научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург¹

Katsnelson B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Kuzmin S.V., Gurvich V.B., Sutunkova M.P., Kireyeva E.P., Minigalieva I.I., Yeremenko O.S.

Analysis of some results of experimental study in nanoparticles' toxicology from the standpoint of hygienic standards setting

Резюме

В статье кратко обобщены ранее публиковавшиеся результаты проведенных авторами экспериментальных исследований, дающих сравнительную характеристику токсичности микро- и наночастиц оксида железа Fe₃O₄ (магнетита) и активности вызываемой ими защитной реакции альвеолярного фагоцитоза. На основе этого обобщения и анализа международного опыта предложены для обсуждения некоторые принципы обоснования допустимого содержания наночастиц в воздухе рабочей зоны и, в частности, рекомендована величина ОБУВ для наночастиц магнетита, равная 0,4 мг/м³.

Ключевые слова: наночастицы, магнетит, лёгочный фагоцитоз, токсичность, ОБУВ

Summary

In these paper the authors summarize some previously published results of their experimental studies characterizing comparatively both toxicity of micro- and nanoscale particles of iron oxide Fe₃O₄ (magnetite) and activity of the defense response of the alveolar phagocytosis evoked by them. Based on these results and analysis of international experience, an approach to substantiating tentative reference exposure levels (TREL) for nanoparticles in workroom air is proposed for discussion, and in particular, the TREL for magnetite nanoparticles equal to 0.4 mg/m³ is recommended.

Keywords: nanoparticles, magnetite, pulmonary phagocytosis, toxicity, tentative reference exposure levels

Введение

За последние годы создано множество материалов, содержащих наноразмерные частицы, к каковым условно относят такие, у которых хотя бы один линейный размер не превышает 100 нм. Наночастицы (НЧ) различных материалов, в том числе, некоторых металлов или их оксидов находят широкое применение в различных отраслях техники, медицины и науки.

Теоретические предпосылки к ожиданию резкого повышения токсичности любого вещества в виде НЧ по сравнению с его микрочастицами освещались многими авторами (например, [5, 7, 10, 16, 18]). Однако анализ литературы убеждает в справедливости утверждения, что «эта общая репутация

более высокой токсичности наночастиц основывается на ограниченном числе исследований» [21], причём некоторые из опубликованных исследований эту репутацию не подтверждают (например [12, 22]).

Хотя проблема рисков для здоровья, создаваемых загрязнением воздуха рабочей зоны наночастицами, широко обсуждается в научной литературе (например, [6, 17, 22]) общая методология обоснования соответствующих гигиенических стандартов всё ещё отсутствует, а примеры их установления в мировой практике единичны. Поэтому в большинстве случаев рекомендации по оценке и управлению этими рисками делаются с оговоркой, что безопасные уровни экспозиции к конкретным НЧ неизвестны [11]. При такой существенной неопределённости, в мероприятиях по защите здоровья лиц, работающих в производстве и использовании наноматериалов преобладает подход, основанный на «парадигме предосторожности» (the precautionary approach² (например, [8]). Полагая этот подход на данном этапе развития рассматриваемой проблемы вполне оправ-

¹ Исследования, обобщаемые в данной статье, проводились в содружестве с ООО «Научно-производственное внедренческое предприятие «ИВА» (М.Я. Ходос, А.Н. Кошчина и др.), ГОУ «Уральский государственный университет им. А.М. Горького» (В.Я. Шур, Е.В. Николаева и др.), ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» (И.Е. Валамына) и МУ «Клинико-диагностический центр» (Л.Г. Улакина, С.В. Пирогова, Я.Б. Бейзов) и все исполнители этих исследований являлись соавторами первичных публикаций на основе их результатов. Работа проведена в рамках Федеральной целевой программы Министерства образования и науки РФ «Развитие инфраструктуры нанотехнологий в Российской Федерации на 2008-2010 годы»

данным, мы однако убеждены в том, что обоснование хотя бы ориентировочных безопасных концентраций в воздухе рабочей зоны для всех наноматериалов, внедряемых в реальное производство, является актуальной задачей, нерешённость которой размывает ориентиры управления рисками и лишает нормативной опоры надзорные органы.

Тем не менее, прежде всего необходимо было обсудить вопрос о том, насколько эффективны нормальные физиологические механизмы защиты от отлагающихся в глубоких дыхательных путях аэрозольных частиц в том случае, когда эти частицы являются нано - размерными, поскольку если организм беззащитен по отношению к НЧ, то едва ли в принципе возможны такие даже очень низкие уровни экспозиции к ним, которые могут быть безвредными для здоровья. Вопрос этот возник перед нами неслучайно, поскольку ещё совсем недавно в литературе преобладали взгляды, согласно которым НЧ вообще плохо распознаются защитными механизмами и, в частности, вызывают слабую аттракцию альвеолярных макрофагов, а поэтому неэффективно выводятся из лёгких [16, 18]. Эти гипотезы с самого начала представлялись нам неубедительными с эволюционных позиций, поскольку все наземные позвоночные столкнулись с ингаляцией природных НЧ (вулканической золы, распыляющейся морской воды, дыма лесных пожаров, сульфатов, образующихся в атмосфере в результате окисления ангидрида и т.д.) тогда же, когда и с ингаляцией микрочастиц, то есть сразу же при переходе на дыхание воздухом. При этом ключевые физиологические механизмы лёгочного клиренса (фагоцитоз и мукоцилиарный транспорт частиц) обнаруживаются уже у земноводных.

Наши собственные эксперименты проводились с водными суспензиями специально синтезированных частиц оксида железа Fe_3O_4 (магнетита) диаметром 10 нм, 50 нм и 1 мкм (методика получения описана в [13, 15]) и в дальнейшем с наночастицами серебра и золота диаметром 3-4 нм, полученными методом лазерной абляции металла в воде; все эти наноматериалы использовались без каких-либо эмульгаторов или стабилизаторов. Результаты наших исследований неоднократно докладывались на представительных научных форумах, в том числе, международных и публиковались как в России, так и за рубежом [1-4, 13-15]. Это позволяет ограничиться обобщённой констатацией основных итогов проведенной работы и впервые рассмотреть их в аспекте гигиенического нормирования.

Полученные нами результаты в целом согласуются с упомянутым выше теоретическим ожиданием, что даже вещество, которое в грубодисперсном состоянии или в виде тонкой фракции частиц микрометрового диапазона является биологически мало агрессивным, в нано - состоянии может обладать высокой цитотоксичностью (в частности, показанной нами для альвеолярных макрофагов) и системной токсичностью (исследовавшейся путём повторных внутрибрюшинных инъекций). Вместе с тем, мы

показали, что эта высокая биоагрессивность определяется не только нано - размером частиц как таковым, но и их химической природой, так что при совпадающей нано - размерности токсичность разных металлов может отличаться весьма существенно.

Однако соотношение между размером частиц в пределах условленного нано - диапазона и их токсичностью является сложным и неоднозначным. Это зависит от соотношения между интенсивностью первичного токсического действия НЧ на клеточно-органном уровне и часто противоположно направленными токсико-кинетическими механизмами, контролирующими резорбцию (в том числе, прямую пенетрацию) и биоаккумуляцию вещества, воздействующего на организм в нано - состоянии. В результате накопление наномагнетита 50 нм в органах, богатых клетками РЭС, и их повреждение оказались более значительными, чем при действии наномагнетита 10 нм, хотя по многим другим показателям на организменном уровне НЧ 10 нм токсичнее. При этом по всем показателям обе фракции НЧ намного токсичнее микрочастиц, которые к указанной пенетрации практически неспособны.

Что же касается распространённой гипотезы о якобы неспособности защитных физиологических механизмов распознавать наночастицы и адекватно реагировать на их поступление в организм, то по крайней мере, в отношении фагоцитарной реакции самоочищения глубоких дыхательных путей эта гипотеза, судя по нашим результатам, должна быть отвергнута. Мы показали, что отложение НЧ в глубоких дыхательных путях вызывает намного более интенсивный приток фагоцитирующих клеток, чем отложение не только микрочастиц того же оксида железа, но и полидисперсных частиц кварцевой пыли или пыли диоксида титана. Высокоинтенсивная реакция того же характера вызывается и наночастицами золота, а в ещё большей степени - серебра. Очень высокая фагоцитарная активность не только альвеолярных макрофагов, но и параллельно мобилизуемых нейтрофильных лейкоцитов по отношению к НЧ оксида железа была подтверждена взаимно согласующимися результатами оптической, полуконтактной атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии. При этом ультраструктурные изменения клетки выявили выраженную способность указанных НЧ вызывать повреждение её мембранных образований.

С нашей точки зрения, все эти результаты свидетельствуют о то, что:

(а) гигиенические нормативы, обеспечивающие безопасность для здоровья работающих под воздействием НЧ, в принципе возможны;

(б) вместе с тем, такие допустимые уровни должны быть хотя бы на порядок величин ниже тех, которые установлены или обоснованно рекомендованы в качестве ПДК или ОБУВ (или соответствующих зарубежных стандартов) для химически идентичных микрочастиц;

(в) при наличии надёжной сравнительно-токсикологической информации ускоренный подход к нормированию, основанный на таком принципе, является оптимальным, если даже и ориентировочным, на данном этапе развития как нанотехнологий, так и нанотоксикологии;

² Так называемая «парадигма предосторожности» состоит в том, что если имеются обоснованные опасения вреда, то даже при научной неопределённости причинно-следственных связей необходимо принимать все доступные превентивные меры, заменяя вопрос о допустимом уровне вредного воздействия вопросом о том, насколько низкий его уровень практически достижим.

(г) в тех или иных конкретных случаях может оказаться необходимым и пока достаточным установление единого норматива для всего нано - диапазона частиц определённого вещества ввиду неоднозначности различий действия НЧ разного размера.

Обращаясь к международному опыту, можно сослаться на недавно предложенную американским National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) величину REL (Recommended Exposure Level) для НЧ диоксида титана 0,3 мг/м³, что в 8 раз ниже, чем для «тонких» (т.е. микрометровых) частиц того же вещества (2,4 мг/м³) [9]. При этом было высказано мнение, что «подобным же образом для частиц других материалов, если их токсичность варьирует в зависимости от размера частиц (при одной и той же дозе по массе), установление различающихся пределов экспозиции для фракций, различающихся по размерам, может быть разумным подходом к защите подвергающихся экспозиции рабочих». Можно отметить, однако, что разнообразные нано - порошки диоксида титана производятся промышленностью и поступают на мировой рынок для различного использования при существенно различающихся размерах первичных НЧ (например, приблизительно 10 нм, 10-30 нм, ≤50 нм). Следовательно, мы можем сказать, что предложение одной и той же величины REL для любых «искусственных» НЧ (engineered nanoparticles) этого вещества, причём почти на порядок ниже, чем для микрочастиц, хорошо согласуется с вышеприведёнными общими соображениями.

Австралийское правительственное агентство "Safe work Australia" [19] использует похожий подход в качестве общего способа установления ориентировочного норматива BEL (Benchmark Exposure Level) для различных наноматериалов, струпированных по природе и свойствам. В частности, для группы, включающей нанокристаллы, квантовые точки, керамические оксиды и металлы, BEL устанавливается путём умножения норматива WEL (Workplace Exposure Limit, что примерно соответствует российской ПДК) для соответствующего химического вещества на понижающий коэффициент 0,066. Другими словами, величина снижается в 15 раз (на полтора порядка), что радикальнее предложения NIOSH. Отметим, что и в австралийской системе нормирования НЧ конкретная размерность частиц в пределах нано - диапазона не учитывается.

Некоторая условность использования предлагаемого подхода для обоснования допустимой концентрации НЧ Fe₃O₄ заключается в том, что ПДК в воздухе рабочей зоны или соответствующие нормативы других стран установлены не для пыли Fe₃O₄, а для пыли или дыма Fe₂O₃. Однако, судя по литературе, существенных различий токсичности этих двух оксидов железа нет. Свидетельством этого может служить следующий факт, также относящийся к установлению допустимых экспозиций: Объединённый Комитет экспертов по пищевым добавкам (Joint Expert Committee on Food Additives) Всемирной организации здравоохранения и Организации ООН по пище и сельскому хозяйству устанавливает одну и ту же величину допустимого ежедневного потребления (Acceptable Daily Intake) железа для Fe₃O₄ и для Fe₂O₃.

Поэтому в качестве исходной величины для расчёта допустимого содержания нано-Fe₃O₄ в воздухе рабочей зоны

мы считаем возможным ориентироваться на имеющиеся нормативы для Fe₂O₃ в полидисперсном микрометрическом диапазоне. Мы сопоставили российскую среднесменную ПДК 6 мг/м³ с соответствующим федеральным нормативом США – PEL (Permissible Exposure Level) 10 мг/м³ (по Fe), используемой в той же стране рекомендацией NIOSH - REL 5 мг/м³ (по Fe), а также принятыми в отдельных провинциях Канады среднесменными OEL (Occupational Exposure Limit) 5 мг/м³ для респираторной фракции (в провинции Альберта) или 10 мг/м³ для суммарной пыли (в провинции Британская Колумбия). Можно видеть, что при пересчёте российской ПДК на элемент железо она оказывается наиболее низкой из всех перечисленных – приблизительно 2 мг/м³. Стремясь обеспечить наибольший запас безопасности, мы принимаем не только именно российский норматив для оксида железа, но и жёсткий австралийский понижающий коэффициент для нормирования металлических НЧ, что даёт величину (по веществу без пересчёта на Fe), равную 6 × 0,066 ≈ 0,4 мг/м³. Можно отметить также, что эта концентрация в 12,5 раз ниже канадского норматива для респираторной фракции пыли оксида железа (такое сопоставление оправдано тем, что все НЧ являются респираторными).

Учитывая заведомо ориентировочный характер использованного подхода к обоснованию этой величины, мы считаем целесообразным предложить ее лишь в качестве ОБУВ. Вероятно, этот статус на данном этапе необходим и достаточен для аналогичных нормативов по многим другим наноматериалам, а для перехода к ПДК понадобятся дальнейшие исследования на базе развитой техники строго дозированных хронических ингаляционных экспозиций к нано - аэрозолям и с углублённым анализом всех вредных эффектов, в том числе, к иногда подозреваемой генотоксичности и канцерогенности НЧ.

Выводы

1. На основе обобщения собственных экспериментальных данных и анализа международного опыта управления рисками для здоровья при работе с наноматериалами предложены для обсуждения следующие положения:

(а) допустимые концентрации наночастиц в воздухе рабочей зоны, обеспечивающие безопасность для здоровья работающих, в принципе возможны;

(б) такие допустимые концентрации должны быть хотя бы на порядок величин ниже тех, которые установлены или обоснованно рекомендованы для химически идентичных микрочастиц;

(в) при наличии надёжной сравнительно-токсикологической информации ускоренный подход к ориентировочному нормированию, основанный на таком принципе, является оптимальным;

(г) в тех или иных конкретных случаях может оказаться необходимым и пока достаточным установление единого норматива для всего нано - диапазона частиц определённого вещества ввиду неоднозначности различий действия наночастиц разного размера.

2. Исходя из этих общих положений, может быть рекомендована величина ОБУВ для наночастиц магнетита, равная 0,4 мг/м³ ■

Кацнельсон Б.А., д.м.н., профессор, руководитель отдела токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Привалова Л.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Дегтярёва Т.Д., д.б.н., Кузьмин С.В., д.м.н., профессор, руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия, г. Екатеринбург; Гурвич В.Б., д.м.н., директор ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Сутункова М.П., научный сотрудник ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Киреева Е.П., к.м.н., старший научный сотрудник ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Мицигалиева И.А., к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Ерёмченко О.С., научный сотрудник ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за ведение переписки – Кацнельсон Борис Александрович, 620014, г. Екатеринбург, ул. Попова, д. 30. тел.: 8-(343)-371-87-21

Литература:

1. Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Кузьмин С.В. и др. Сравнительная оценка реакции альвеолярного фагоцитоза на интратрахеальное введение частиц магнетита (Fe₃O₄) нано - и микрометрового диапазонов. Мед. труда и пром. экология. 2010; 2: 12-16.
2. Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Кузьмин С.В. и др. Экспериментальные данные к оценке пульмоноксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe₃O₄) нано - и микрометрового диапазонов. Токсикологический вестник. 2010; 2: 18-25.
3. Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Кузьмин С.В. и др. К сравнительной характеристике токсичности и опасности частиц разного размера в нано - и микрометровом диапазоне. Здоровье населения и среда обитания. 2011; ч 5: 26-31.
4. Кацнельсон Б.А., Привалова Л.И., Сутункова М.П. и др. Взаимодействие наночастиц оксида железа Fe₃O₄ и альвеолярных макрофагов «in vivo». Бюлл. экспер. биол. и медиц. 2011 (в печати)
5. Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В. и др. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов. Методологические проблемы изучения и оценки био - и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды: матер. пленума. науч. совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравсоцразвития РФ. М., 2007: 4-25.
6. Потапов А.И., Тулакин А.В., ЛА.Луценко и др. Международные стандарты безопасности при профессиональном воздействии наночастиц и гармонизация гигиенических подходов. Здоровье населения и среда обитания. 2011; 5: 19-21.
7. Bastus N.G., Casals E., Socorro V.-C., Puentes V. Reactivity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological media. Nanotoxicology. 2008; 2: 99-112.
8. Broekhuizen (van) P. Dealing with uncertainties in the nanotech workplace practice: making the precautionary approach operational // J. Biomed. Nanotechnol. 2008; 7:15-17.
9. CDC and NIOSH, 2011. Current Intelligence Bulletin 63: Occupational Exposure to Titanium Dioxide. US Department of Health and Human Services (NIOSH) 2011, Publication No 2011-160.
10. Donaldson K., Stone V., Tran C.K. et al. Nanotoxicology (editorial)// Occup. Environm. Med. 2004; V. 61. 727-728.
11. Grosco A., Petri-Fink A., Magrezy Management of nanomaterials safety in research environment. Partic. Fibers Toxicol. 2010; V.7.
12. Karisson H., Gustafsson J., Cronholm P., Muller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles – a comparison between nano - and micrometer size. Toxicol. Letters. 2009; V. 188: 112-118.
13. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Kuzmin S.V. et al. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: are we defenseless against nanoparticles? Int.J Occup. Environ Health. 2010; V.16: 508-524.
14. Katsnelson B.A., Degtyareva T.D., Minigalieva I.I., et al. Sub-chronic systemic toxicity and bio-accumulation of Fe₃O₄ nano - and microparticles following repeated intraperitoneal administration to rats. Internat. J. Toxicol. 2011; V.30: 59-68.
15. Li N., Xia T., Nel A.E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. Free Rad. Biol. Med. 2008; V. 44: 1689-1699.
16. Murashov V., Shulte P., Geraci C., Howard J. Regulatory approaches to worker protection in nanotechnology industry in the USA and European Union. Industr. Health. 2011; V. 49: 280-296.
17. Oberdurstner G., Oberdurstner E., Oberdurstner J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studied of ultrafine particles. Environm. Health. Persp. 2005; V. 113: 823-839.
18. Safe Work Australia. Engineered Nanomaterials: Feasibility of establishing exposure standards and using control banding in Australia. 2010.
19. Warheit D.B., Reed K.L., Sayes C.M. A role fore surface reactivity in TiO₂ and quartz-related nanoparticle pulmonary toxicity. Nanotoxicology. Published online on 26 June 2009.
20. Warheit D.B., Webb T.R., Colvin V.L. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. Toxicol Sci. 2007; V.9: 270-280.
21. Yokel R.A., MacPhail, R.C. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. J. Occup. Med. And Toxicol. 2011; V. 6: 7.