

УДК 546.73:615.015.35

М. А. Землянова<sup>a,b</sup>, А. С. Иванова<sup>a</sup>, М. С. Степанков<sup>a</sup>, А. И. Тиунова<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>b</sup> ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь, Россия

## ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВ НАНОДИСПЕРСНОГО ОКСИДА КОБАЛЬТА ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ И ПЕРОРАЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ

Проведены исследования и оценка острой токсичности и кумулятивных свойств нанодисперсного оксида кобальта при ингаляционном и пероральном путях поступления. Установлено, что изученный образец нанодисперсного оксида кобальта является наноматериалом (размер частиц в поперечнике в 6,8 раза меньше размера частиц микродисперсного аналога (41,2–77,9 нм и 0,281–4,91 мкм соответственно), что может увеличивать его реакционную способность. При ингаляционном поступлении обладает большей проникающей способностью в печень (концентрация составила 0,168 мг/г), что в 2,21 раза выше относительно микродисперсного аналога (0,076 мг/г), большей проникающей способностью в мозг (0,046 мг/г), что в 20,84 раза выше относительно микродисперсного аналога (0,022 мг/г). Обладает более выраженной материальной кумуляцией по сравнению с кумуляцией микродисперсного аналога: в головном мозге концентрация составила 0,733 мг/кг, что в 2,07 раза больше; в печени – 76,94 мг/кг, что в 27,4 раза больше и в почках – 141,608 мг/кг (в 155,3 раза больше).

**Ключевые слова:** наночастицы; оксид кобальта; острая токсичность; кумулятивные свойства; ингаляционное и пероральное поступление.

M. A. Zemlyanova<sup>a,b</sup>, A. S. Ivanova<sup>a</sup>, M. S. Stepankov<sup>a</sup>, A. I. Tiunova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> FSC for Medical and Preventive Health Risk Management Technologie, Perm, Russian Federation

## ASSESSMENT OF ACUTE TOXICITY AND CUMULATIVE PROPERTIES OF NANODISPERSE OXIDE OF COBALT AT INHALATION AND ORAL RECEIPT

The article presents the results of research and assessment of acute toxicity and cumulative properties of nanosized oxide of cobalt at inhalation and oral receipt. Nanoparticles of oxide of cobalt are widely applied in electroinstrument making, chemical and metallurgical industry. It is important to systematize and specify data on physical and toxicological parameters of nanodimensional metal-containing particles at various ways of receipt to an organism. By results of own pilot studies it is established that the studied sample of nanodisperse oxide of cobalt is nanomaterial (the size of particles is equal in diameter to 41,2–77,9 nanometers, is 6,8 times less than particles of microdisperse analog (0,281–4,91mkm)) that can increase its reactionary ability. Doesn't possess acute inhalation and oral toxicity. At inhalation receipt possesses bigger penetration in a liver (concentration has made 0,168 mg/g) that is in 2,21 higher in comparison with microdisperse analog (0,076 mg/g), bigger penetration in a brain (0,046 mg/g) that is in 20,84 higher in comparison with microdisperse analog (0,022 mg/g). Possesses more expressed material cumulation in comparison with a cumulation of microdisperse analog: in a brain (concentration has made 0,733 mg/kg), what is 2,07 times more, in a liver (76,94 mg/kg) - by 27,4 times and in kidneys (141,608 mg/kg) - by 155,3 times.

**Key words:** nanoparticles; cobalt oxide; acute toxicity; cumulative properties; inhalation and oral receipt.

### Введение

Оксидные соединения кобальта в наноразмерном состоянии в настоящее время широко применяются в сфере электропотребления, нанооптики, биодиагностики (в качестве биохимических сенсоров), нанохимии и нанометаллургии [Cobalt (II, III) ..., 2015]. Синтез нанодисперсного оксида кобальта обусловли-

вает поступление в среду обитания наночастиц в виде аэрозолей и дисперсных растворов, создающих опасность для здоровья человека.

В связи с этим, важно систематизировать и уточнить данные о физических и токсикологических параметрах наноразмерных металлосодержащих частиц, в том числе наноразмерного оксида кобальта, при различных путях и длительности поступления в орга-

низм.

Цель работы – оценка острой токсичности и кумулятивных свойств нанодисперсного оксида кобальта при ингаляционном и пероральном поступлении для задач гигиенического нормирования.

### Материалы и методы

Для проведения исследований использован порошок нанодисперсного оксида кобальта (Cobalt (II, III) oxide., рег. номер CAS 1308-06-1, номер продукта 637025), производства компании Sigma-Aldrich (США). Синонимы исследуемого продукта: ультрадисперсный оксид никеля, ультратонкий оксид никеля, монооксид никеля. Для сравнительного анализа использован порошок микродисперсного оксида кобальта (Cobalt (II, III) oxide., рег. номер CAS 1308-06-1, номер продукта 221643).

Аналитическое обобщение информации о физических свойствах нанодисперсного оксида кобальта и сравнительно микродисперсного аналога выполнено по результатам собственных исследований.

Непосредственно перед проведением экспериментальных исследований тестируемые вещества переведены в форму водных суспензий посредством внесения порошка в бидистиллированную воду, соответствующую ТУ 6-09-2502-77. После чего, для разрушения агрегатов и агломератов частиц в исследуемой суспензии нанодисперсного оксида кобальта и для равномерного распределения частиц в объеме проведена ультразвуковая обработка на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls Hd 3200 (Bandelin, Германия) при комнатной температуре в течение 2 мин. в режиме непрерывной пульсации на 65%-ной мощности.

Оценка размера и формы частиц выполнена методом динамического лазерного светорассеяния на анализаторах Horiba LB-550 («Horiba», Япония) и Microtrac S3500 («Microtrac», США); методом электронной микроскопии на сканирующем микроскопе высокого разрешения (3–10 нм, максимальное увеличение  $\times 300000$ ) S-3400N («НПАСИ», Япония) с приставкой для рентгеновского энергодисперсионного микроанализа («Bruker», Германия) и атомно-силовой микроскопии Solver-PRO («НТ-МДТ», США). Исследование и оценка удельной площади поверхности частиц нативных порошков нано- и микродисперсного оксида кобальта выполнена на приборе ASAP 2020 («Micromeritics», США) после дегазации исследуемого материала в вакууме при температуре 350°C в течение 3 ч. Удельная площадь поверхности образцов ( $S_{\text{вст}}$ ) рассчитана по методу, предложенному Брунауэром, Эмметом и Тейлором [Грег, Синг, 1984]. Общий объем пор  $V_{\text{от}}$  рассчитан из количества азота, адсорбированного при относи-

тельном давлении  $p/p_0 \approx 0.99$ . Распределение пор по размерам определено по изотермам десорбции с использованием метода Баррета, Джойнера и Халенды [Barrett, Joyner, Halenda, 1951].

Оценка концентрации кобальта (в пересчете на кобальта оксид) в суспензиях выполнена методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500cx («Agilent Technologies Inc», США) с октопольной реакционной/столкновительной ячейкой. Исследованная концентрация суспензии составила 125 мг/см<sup>3</sup>.

Исследование токсического действия водной суспензии нанодисперсного оксида кобальта в условиях острого эксперимента выполнено на лабораторных животных в соответствии с ГОСТ 32646-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая ингаляционная токсичность – метод определения класса острой токсичности»; с ГОСТ 32644-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности».

Развернутый эксперимент по определению острой токсичности при пероральном пути поступления выполнен на белых мышках-самках линии BALB/C массой 15–25 г в количестве 6 особей. Экспериментальных животных разделили на 2 группы, по 3 особи в каждой: опытная группа № 1 для исследования нанодисперсного порошка, опытная группа № 2 для исследования микродисперсного аналога. Эксперимент проведен в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.

Первоначальная исследованная доза составила 2000 мг/кг массы тела. Период наблюдения составил 14 сут. Средняя смертельная доза вещества (ЛД<sub>50</sub>) определена по результатам выживаемости животных с применением алгоритма, представленного в ГОСТ 32644-2014. Класс опасности установлен в соответствии с ГОСТ 12.1.007.76. «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Развернутый эксперимент по определению острой токсичности при ингаляционном пути поступления выполнен на белых мышках-самках линии BALB/C массой 15–25 г в количестве 6 особей. Экспериментальные животные были разделены на 2 группы, по 3 особи в каждой: опытная группа № 1 для исследования нанодисперсного порошка, опытная группа № 2 для исследования микродисперсного аналога. Эксперимент проведен в соответствии со схемой, представленной на рис. 2.

Первоначальная номинальная концентрация, задаваемая в воздухе камеры, составила 5 мг/дм<sup>3</sup> (при концентрации кобальта в суспензии 125 мг/мл, скорость подачи суспензии 0.4 мл/мин, скорость подачи воздуха 10 л/мин, объем затравочной

камеры – 0,1 м<sup>3</sup>).

Период наблюдения составил 14 сут. Среднюю смертельную концентрацию вещества (СЛ50) определяли по результатам выживаемости животных с применением алгоритма, представленного в ГОСТ 32646-2014.

Развернутый эксперимент по оценке кумулятивных свойств нано- и сравнительно микродисперсного оксида кобальта выполнен на мышьях самках и самцах линии BALB/C в количестве 20 особей. Экспериментальные животные разделены

на 2 группы, по 10 особей в каждой: опытная группа № 1 для исследования нанодисперсного порошка, опытная группа № 2 для исследования микродисперсного аналога. В первые 4 дня вводили дозу исследуемых веществ, которая составляла 1/10 ЛД50 (500 мг/кг массы тела), затем каждые последующие 4 дня дозу увеличивали в 1,5 раза. Эксперимент проводили в течение 20 дней в соответствии со схемой, предложенной МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» [2009].

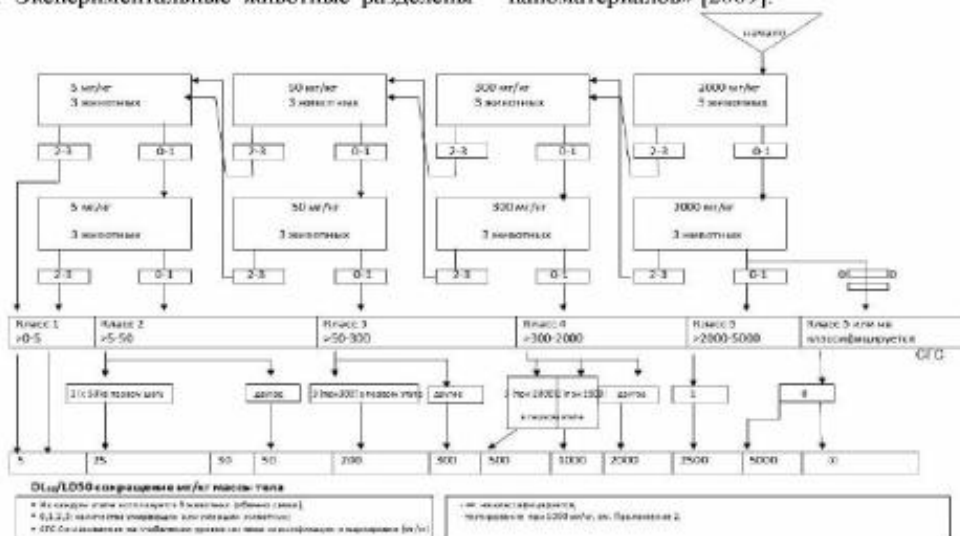


Рис. 1. Схема тестирования острой токсичности при пероральном поступлении в соответствии с ГОСТ 32644-2014

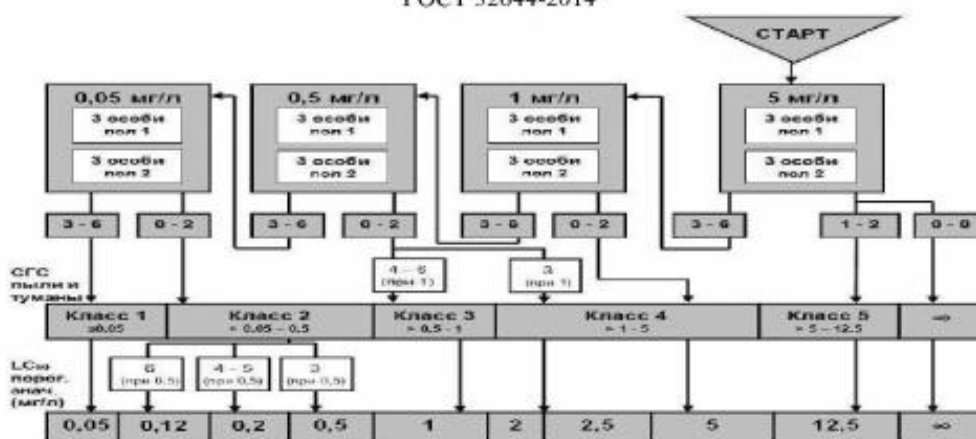


Рис. 2. Схема тестирования острой токсичности при ингаляционном поступлении в соответствии с ГОСТ 32646-2014

Работа с животными выполнена в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных [Guide for the care ..., 2011], Правилами лабораторной практики [Об утверждении ..., 2010]. Токсикологические эксперименты проведены в соответствии с правилами, принятыми Международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных и Этическим комитетом

ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» [Международные ..., 1985].

### Результаты и их обсуждение

Оценка физических свойств тестируемого вещества показала, что размер в поперечнике наночастиц равен 41,2–77,9 нм, что в 6,8 раза меньше размера микрочастиц (0,281–4,91 мкм). Форма на-

ночастиц преимущественно сферическая, микро- частиц – неправильная. Изображение частиц нано-

и микродисперсного оксида кобальта представлено на рис. 3.

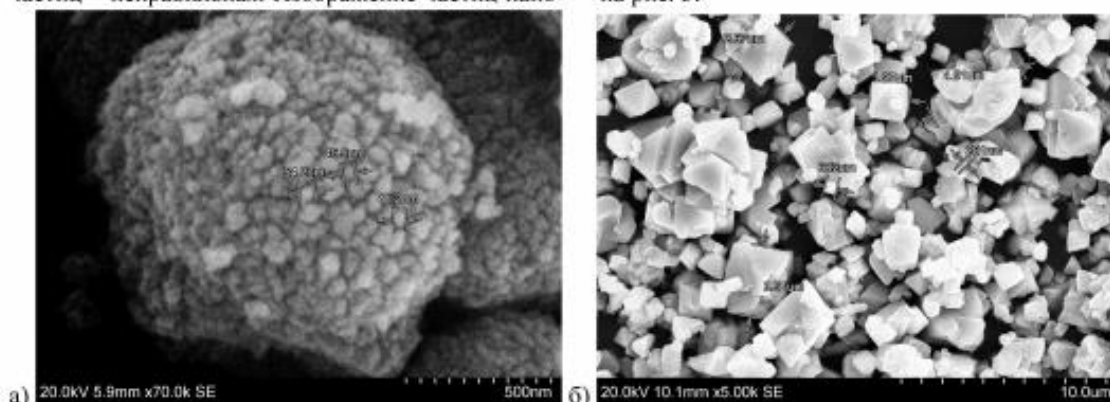


Рис. 3. Изображение частиц с помощью сканирующей электронной микроскопии:

а) нанодисперсный оксид кобальта, б) микродисперсный оксид кобальта

Объем пор с радиусом меньше 32.0 нм у наночастиц равен  $0.106 \text{ см}^3/\text{г}$ , что в 53 раза больше микрочастиц ( $0.002 \text{ см}^3/\text{г}$ ). Удельная площадь поверхности наночастиц  $42.1 \pm 0.3 \text{ м}^2/\text{г}$ , что в 46.7 раз больше удельной площади поверхности микро- частиц ( $0.9 \text{ м}^2/\text{г}$ ).

Исследование острой токсичности показало, что при однократном внутрижелудочном введении через зонд мышам линии BALB/C водных суспензий нано- и микродисперсного оксида кобальта в дозе 2000 мг/кг массы тела гибели животных в течение 14 дней эксперимента не установлено. Следовательно, острой токсичностью данные вещества для мелких грызунов не обладают ( $\text{ЛД}_{50} > 2000$ ).

Оценка острой токсичности при ингаляционном воздействии показала, что нанодисперсный оксид кобальта и микродисперсный аналог острой токсичностью для мелких грызунов не обладают

( $\text{СЛ}_{50} > 5$ ). При ингаляционном поступлении концентрация нанодисперсного оксида кобальта в печени составила  $0.168 \text{ мг/г}$ , что в 2.21 раза выше концентрации микродисперсного оксида кобальта ( $0.076 \text{ мг/г}$ ). Концентрация исследуемого вещества в мозге равна  $0.046 \text{ мг/г}$ , что в 20.84 раза выше концентрации микродисперсного аналога ( $0.022 \text{ мг/г}$ ). Концентрация нанодисперсного оксида кобальта в крови составила  $33.66 \text{ мг/г}$ , а концентрация в ткани легких –  $5.72 \text{ мг/г}$ .

Сравнительная оценка кумуляции при пероральном поступлении показала, что и исследуемое вещество, и микродисперсный аналог накапливаются в органах (печень, мозг, почки), но нанодисперсный оксид кобальта накапливается в большей концентрации. Концентрации нанодисперсного и микродисперсного оксида кобальта в печени, в мозге и в почках приведены в таблице.

#### Концентрации нанодисперсного и микродисперсного оксида кобальта в органах при исследовании кумуляции

Органы	Концентрация вещества в органах, (мг/кг)	
	Нанодисперсный оксид кобальта	Микродисперсный оксид кобальта
Печень	76.940	2.808
Мозг	0.733	0.354
Почки	141.608	0.912

Концентрация нанодисперсного оксида кобальта в печени больше в 27.4 раза концентрации микродисперсного аналога, в мозге – в 2.07 раза, в почках – в 155.3 раза

#### Выводы

Исследованный образец оксида кобальта является наноматериалом с размером частиц в поперечнике 41.2–77.9 нм, что в 6.8 раза меньше размера частиц микродисперсного аналога (0.281–4.91 мкм). Меньший размер частиц нанодисперсного оксида кобальта может увеличивать проникающую и реакционную способность. Исследован-

ный образец не обладает острой ингаляционной и пероральной токсичностью, относится к 4-му классу опасности (малоопасное) по критерию  $\text{ЛД}_{50}$  и  $\text{СЛ}_{50}$ .

При остром ингаляционном поступлении в виде аэрозоля обладает большей проникающей способностью в печень и мозг (в 2.21 раза и 20.84 раза соответственно выше относительно микродисперсного аналога).

При внутрижелудочном введении обладает более выраженной материальной кумуляцией в виде накопления в головном мозге, печени почках (в 27.4; 2.07; 155.3 раза больше соответственно отно-

сительно накопления микродисперсного аналога).

### Библиографический список

- Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984. 306 с.
- Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Совет международных научных организаций. 1985. С. 3-7.
- Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Минздрава России № 708Н. М., 2010.
- Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: методические указания № 1.2.2520-09. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 43 с.
- Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. Vol. 73. P. 373-380.
- Cobalt (II, III) oxide nanopowder, <50 nm particle size (TEM), 99.8% trace metals: material safety data sheet (MSDS) // Sigma-Aldrich. 2015. 8 p.
- Guide for the care and use of laboratory animals / National Research Council of the national academies. Washington: The national academies press, 2011. 248 p.

### References

- Greg S., Sing K. *Adsorbents, udel'naja poverchnost'*,

### Об авторах

Землянова Марина Александровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15; zem@fcrisk.ru; (342)2363930

Зав. отделом биохимических и цитогенетических методов диагностики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» 614045, Пермь, ул. Монастырская, 82

Иванова Анастасия Сергеевна, магистрант биологического факультета ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Степанков Марк Сергеевич, студент биологического факультета ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Тиунова Анастасия Игоревна, магистрант биологического факультета ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

*poristost'* [Adsorption, the specific surface area, porosity]. Moscow, Mir Publ., 1984. 306 p. (In Russ.).

*Mezhdunarodnye rekomendacii (etičeskij kodeks) po provedeniju mediko-biologičeskich issledovanij s ispol'zovaniem životnyh* [International guidelines (code of ethics) to conduct biomedical research using animals] // *Sovet mezhdunarodnyh naučnyh organizacij* [Board of international scientific organizations]. 1985. P. 3-7. (In Russ.).

*Ob utverzhenii pravil laboratornoj praktiki: prikaz Minzdravsocrazvitija Rossii № 708N* [On approval of the rules of good laboratory practice: Russian Health Ministry order number 708N]. Moscow, 2010. (In Russ.).

*Toksikologo-gigieničeskaja ocenka bezopasnosti nanomaterialov: metodičeskie ukazanija № 1.2.2520-09* [Toxicological-hygienic assessment of safety of nanomaterials]. Moscow, Federal'nyj Centr gigeny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, 2009. 43 p. (In Russ.).

Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* V. 73 (1951): pp. 373-380.

Cobalt (II, III) oxide nanopowder, <50 nm particle size (TEM), 99.8% trace metals: material safety data sheet (MSDS). Sigma-Aldrich. 2015. 8 p.

Guide for the care and use of laboratory animals / National Research Council of the national academies. Washington, The national academies press, 2011. 248 p.

Поступила в редакцию 20.09.2016

### About the authors

Zemlianova Marina Aleksandrovna, doctor of Medicine, professor of the Department of human ecology and life safety Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; zem@fcrisk.ru; (342)2363930

Head of Department of biochemical and cytogenetic diagnostics FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies". 82, Monastyrskaya str., Perm, Russia, 614045

Ivanova Anastasia Sergeevna, graduate student of biological faculty Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Stepankov Mark Sergeevich, student of biological faculty Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Тиунова Анастасия Игоревна, graduate student of biological faculty Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990