

METHODICAL APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF TOXICITY AND HAZARD OF NANOMATERIALS

Leonenko N.S., Demetska O.V., Leonenko O.B.

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ТА НЕБЕЗПЕКИ НАНОМАТЕРІАЛІВ

С

**ЛЕОНЕНКО Н.С.,
ДЕМЕЦЬКА О.В.,
ЛЕОНЕНКО О.Б.**

ДУ «Інститут
медицини праці
НАМН України»,
м. Київ

УДК [(54-
148:543.3):615.9]:
005

Ключові слова:
наноматеріали,
наночастинки,
токсичність,
небезпека.

учасний розвиток нанотехнологій випереджає розробку підходів до оцінки токсичності та небезпеки наноматеріалів (НМ). Незважаючи на більш ніж п'ятнадцятирічні дослідження в усьому світі існуючі дані не дозволяють зробити остаточні висновки. Через високий рівень складності та невизначеності багатьох аспектів у цій сфері оцінка ризику та наукове обґрунтування відповідних стратегій і правил пов'язані з певними перешкодами. Вважається, що традиційних підходів для вивчення токсичності хімічних речовин недостатньо для дослідження об'єктів у нанодіапазоні [1]. Проведення оцінки безпеки НМ та нанопродукції звичайними класичними токсикологічними методами також ускладнене через необхідність проведення значних обсягів досліджень. Останнім часом у публікаціях акцентується увага на залежності прояву біологічних ефектів від зміни характеристик і властивостей НМ, що неможливо враховувати у стандартних токсикологічних дослідженнях. Таким чином, незважаючи на значний масив експериментальних даних існує нагальна потреба щодо вдосконалення наукових підходів до оцінки токсичності та потенційної небезпеки НМ. Одним із шляхів інтенсифікації випробувань і зниження їхньої собівартості може бути застосування прискорених токсикологічних досліджень на простих біологічних

системах. У зв'язку з цим розробка і впровадження альтернативних методів *in vitro* стала одним з провідних напрямків токсикологічних досліджень НМ. Пропонуються до використання різні тест-системи, такі як найпростіші мікроорганізми, клітинні та субклітинні елементи, гідробіонти, рослини, комахи, сперма великої рогатої худоби, судини хоріоаллантоїсної оболонки (ХАО) курячого ембріона тощо [2, 3].

Алгоритм токсикологічних досліджень НМ може бути розроблений з урахуванням передбачуваної причини небезпечного впливу. Для попередніх оцінок рекомендується застосовувати скринінгові набори тестів. Їх вибір залежить від знання даних про хімічні, фізичні та біологічні властивості досліджуваного наноб'єкту. Слід зазначити, що альтернативні методи токсикологічних досліджень на міжнародному рівні розвиваються завдяки об'єднаним зусиллям різних організацій, зокрема. Організацією економічного співробітництва і розвитку (ОЕСР) було створено базу даних з наукових досліджень у сфері безпеки НМ. Рекомендовані методи оцінки токсичності передбачають використання різних моделей для досліджень, крім ссавців. Водночас наголошується, що серед існуючих методик і тест-систем необхідно обирати найбільш інформативні, стандартизовані, що мають об'єктивну цифрову оцінку результатів і добре корелюють з даними, отриманими на тваринах [4]. Таким чином, незважаючи на численність запропонованих тест-систем для скринінгової оцінки впливу нанорозмірних речовин гостро стоїть питання вибору з них найбільш чутливих, залежно

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ
Леоненко Н.С., Демецкая А.В., Леоненко О.Б.
ГУ «Институт медицины труда НАМН Украины», г. Киев

Состояние проблемы. Несмотря на многочисленность тест-систем для скрининговой оценки влияния наноразмерных веществ на организм остро стоит вопрос выбора из них наиболее чувствительных, в зависимости от целей и задач исследования.

Цель работы заключалась в исследовании токсичности некоторых образцов наноматериалов (НМ) по интегральному показателю общетоксического действия на кратковременной культуре сперматозоидов быка и обобщении мирового опыта оценки токсичности и опасности наночастиц (НЧ) и НМ.

Материалы и методы. Исследована цитотоксичность НЧ металлов (Mn, Co, Mg, Zn, Fe, Mo, Au) в цитратных растворах. Размер частиц определяли на анализаторе «Fritch» (Германия). Оценку токсичности осуществляли на анализа-

торе АТ-05.

Результаты. НЧ молибдена, железа, магния, кобальта и марганца в нативном растворе не проявили цитотоксического действия, однако НЧ золота обнаружили цитотоксический эффект ($I_t = 20,2\%$). При повторном исследовании они проявляли цитотоксическое действие в концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л ($I_t = 44,2\%$), $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ($I_t = 68,4\%$), только в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л не было обнаружено цитотоксического действия ($I_t = 100\%$). Во многом это может быть обусловлено физико-химическими свойствами НЧ золота и меньшим размером по сравнению с другими исследованными металлами.

Выводы. Использование альтернативных методов необходимо для скрининговой оценки токсичности НМ или наносодержащей продукции. Существует настоятельная необходимость совершенствования научных подходов к оценке их токсичности и опасности.

Ключевые слова: наноматериалы, наночастицы, токсичность, опасность.

© Леоненко Н.С., Демецька О.В., Леоненко О.Б. СТАТТЯ, 2017.

від мети і завдань дослідження.

Отже, **мета роботи** полягала у дослідженні токсичності деяких зразків НМ за інтегральним показником загальнотоксичної дії на короткочасній культурі сперматозоїдів бика і узагальненні світового досвіду оцінки токсичності та безпеки наночастинок (НЧ) і НМ.

Матеріали і методи досліджень. Досліджено цитотоксичність НЧ металів (Mn, Co, Mg, Zn, Fe, Mo, Au) у цитратних розчинах. Розмір частинок визначали на аналізаторі «Fritch» (Німеччина).

Оцінку токсичності здійснювали за індексом токсичності (I_t) у дослідах *in vitro* з використанням сперматозоїдів великої рогатої худоби як тест-об'єкта на аналізаторі зображень AT-05 [5]. Показниками токсичності була величина індексу токсичності (I_t), що дорівнює співвідношенню параметрів рухливості індикаторних клітин у досліджуваному зразку та їхньої рухливості у контрольному зразку. Експрес-оцінка токсичності НМ з використанням вищезазначеного способу дозволяє оцінити ефект від впливу НМ за час, що не перевищує 3 години. При значенні індексу токсичності від 1% до 70% та понад 120% досліджуваний зразок вважається токсичним.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що НЧ

молібдену, заліза, цинку, магнію, кобальту та марганцю у нативному розчині не спричиняли цитотоксичної дії, натомість НЧ золота виявили цитотоксичний ефект ($I_t = 20,2\%$) (табл. 1). При повторному дослідженні НЧ золота виявляли цитотоксичну дію у концентраціях $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л ($I_t = 44,2\%$) та $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ($I_t = 68,4\%$) і лише у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л не спричиняли цитотоксичної дії ($I_t = 100\%$). Певною мірою це може бути зумовлено фізико-хімічними властивостями НЧ золота та розміром, який був меншим порівняно з іншими дослідженими металами. До речі, ці дані кореспондують з результатами досліджень впливу НЧ золота різних розмірів на культуру дендритних клітин людини, де найбільш несприятливі ефекти спричиняли наночастинки найменших розмірів [6].

Слід зазначити, що середній розмір (у випадку сферичних НЧ — аеродинамічний діаметр) НЧ у розчині не є однозначною величиною, оскільки його значення можуть суттєво відрізнятись залежно від того, який саме показник враховується. Справа у тому, що значення середнього розміру НЧ за інтенсивністю сигналу, що випромінюється, за об'ємом, який мають частинки у розчині, а також за їхньою кількістю можуть суттєво відрізнятись. Зокрема, якщо розмір НЧ золота за кількістю частинок

становить 17 нм (рис. 1), то за об'ємом та інтенсивністю сигналу він становить вже 32 нм та 65 нм відповідно і графічно виглядає, як функція нормального розподілу Гауса з характерною симетричною кривою у формі «дзвону» (рис. 2, 3).

Загалом цитотоксичність НМ має неоднозначну залежність від їхніх розмірів та може бути зумовленою різними факторами. Так, у наших дослідженнях [7] було встановлено, що цитотоксичність НЧ сульфідів кадмію та свинцю значною мірою залежала від хімічної природи стабілізаторів. Зокрема, серед стабілізаторів поліетиленіміну (ПЕІ), желатину, поліфосфату натрію (ПФНа), меркаптопропіонової кислоти (МПК) цитотоксичність виявлено у ПЕІ та желатину, причому для першого вона була максимальною у концентрації 0,25% порівняно з 10% та 100% станом (I_t відповідно 1%, 13,8% та 17,2%), а 0,1% желатин також був більш токсичним порівняно з 1% його аналогом (I_t відповідно 150% та 107,4%). Останнє може бути пов'язаним зі структурою желатину, через яку не тільки власне НЧ, але й також цвітєріони (біполярні іони) желатину 1% перебувають у більш зв'язаному та агрегованому стані порівняно з 0,1% желатином (з більшою кількістю активних центрів та реакційною здатністю).

У свою чергу, при оцінці цитотоксичності НЧ сульфідів кадмію (1,8-2 нм, 4-6 нм, 15-20 нм) у різних стабілізаторах розмірно-ефективної залежності не виявлено [7]. Нативні розчини НЧ сульфідів кадмію розміром 4-6 нм, стабілізовані МПК, та розміром 15-20 нм, стабілізовані ПФНа, справляли цитотоксичну дію. Найбільш токсичними були наночастинки сульфідів кадмію (15-20 нм), стабілізовані ПЕІ, оскільки цитотоксичний ефект спостерігався навіть при розведенні їх. Також проведеними дослідженнями було встановлено, що НЧ сульфідів свинцю розміром 10-15 нм не виявили цитотоксичної дії, натомість НЧ сульфідів свинцю розміром 40-50 нм, стабілізовані 0,1% желатину, справляли цитотоксичний ефект.

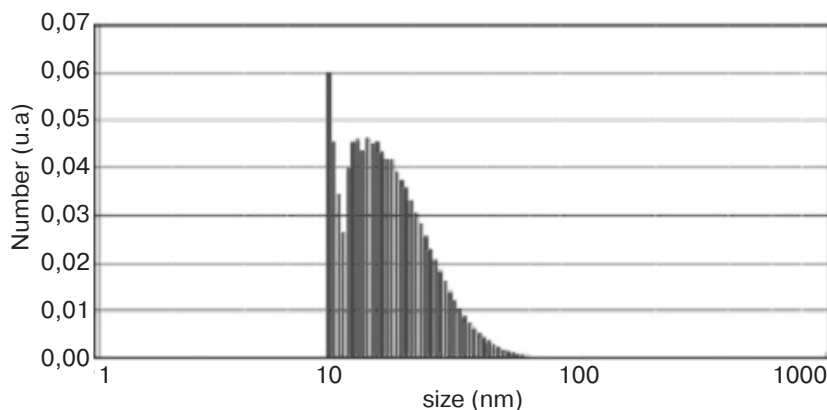
Таким чином, отримані дані свідчать на користь того, що цитотоксичність НМ може бути зумовленою як фізико-хімічними

Цитотоксичність наночастинок металів у цитратних розчинах

Метал	Mn	Co	Mg	Zn	Fe	Mo	Au
Розмір, нм	30-40	50-60	40-50	70-80	70-80	60-70	16-18
Концентрація моль/л	2410 ⁻²	2410 ⁻²	9410 ⁻²	7410 ⁻²	5410 ⁻²	6410 ⁻³	1410 ⁻³
I_t , %	106,9	101,4	112,7	100,7	84,8	79,2	20,2

Рисунок 1

Дисперсія НЧ відповідно до загальної кількості частинок



METHODICAL APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF TOXICITY AND HAZARD OF NANOMATERIALS
Leonenko N.S., Demetska O.V., Leonenko O.B.
 SI "Institute of Occupational Medicine, NAMSU",
 Kyiv

Background. Despite the large number of test systems for screening assessment of the impact of nanoscale substances on the organism, a choice of the most sensitive ones, depending on the objectives and tasks of the study, is a high-priority task.

Objective. We studied a toxicity of some nanomaterial (NM) samples by a combined indicator of the effect of general toxicity on the short-term culture of the bull's spermatozoa and generalization of the world experience in assessment of the toxicity and hazard of nanoparticles (NPs) and NMs.

Materials and methods. We investigated a cytotoxicity of nanoparticles (NPs) of metals (Mn, Co, Mg, Zn, Fe, Mo, Au) in the citrate solution. Particle sizes were measured by the analyzer «Fritch» (Germany). Toxicity assessment was performed on

the AT-05 analyzer.

Results. NPs of molybdenum, iron, magnesium, manganese, and cobalt didn't show a cytotoxic effect in the native solution but gold NP demonstrated the cytotoxic effect ($I_t = 20.2\%$). In repeat study they demonstrated the cytotoxic effect in the concentrations of $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l ($I_t = 44.2\%$), $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l ($I_t = 68.4\%$) and the cytotoxic effect wasn't detected only in the concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l ($I_t = 100\%$). In many respects this can be due to the physical-and-chemical properties of gold NPs and size which was less in comparison with other studied metals.

Conclusions: Application of the alternative methods is necessary for screening assessment of the NM toxicity or nanoproducts. There is an urgent need to improve the scientific approaches to the assessment of their toxicity and hazard.

Keywords: nanomaterials, nanoparticles, toxicity, hazard.

ми властивостями та розміром НЧ, так і несучою фазою та стабілізаторами. При цьому не існує загальних закономірностей щодо їхнього впливу на токсичні властивості НЧ, тому ці взаємозв'язки слід встановлювати окремо у кожному індивідуальному випадку. Водночас інформація, отримана в експериментах *in vitro*, може бути використана для скринінгу токсичності НМ в якості «вектора» щодо проведення поглиблених експериментальних досліджень *in vivo*.

Необхідно відзначити, що використання *in vitro* систем для оцінки нанотоксичності схвалено Європейським центром валідації альтернативних методів ЄС [4]. Запропоновані методи *in vitro*-діагностики охоплюють різні області: репродуктивну токсичність, оцінку потенційної канцерогенності, трансфер через різні бар'єри (шкіра, епітелій судин, гематоенцефалічний бар'єр тощо). Можна виділити декілька модельних систем для оцінки токсичності НМ *in vitro*: клітинні лінії, експресія генів, окислювальний стрес, пошкодження мітохондрій, ДНК, клітинні дисфункції, поглинання. Системи *in vitro* дозволяють контролювати такі параметри цитотоксичності, як морфологія клітин, їхня життєздатність, проліферація, запальні процеси, окислювальний стрес. У дослідженнях *in vitro* показано залежність токсичності від розміру, форми і концентрації НЧ [9], а також встановлено деякі механізми токсичної дії (окислювальний стрес, апоптоз)

[10]. Загалом за результатами досліджень виявлено високу чутливість альтернативних моделей та їхню здатність у гострому експерименті встановлювати токсичний ефект доз, що викликають подібний ефект у тварин лише за умов тривалих експериментів. Цей факт є надзвичайно важливим, оскільки використання альтернативних підходів дозволить отримати скринінгову оцінку токсичності досліджуваних НМ або нанопродукції, що дуже актуально в умовах зростаючих обсягів їх виробництва та застосування.

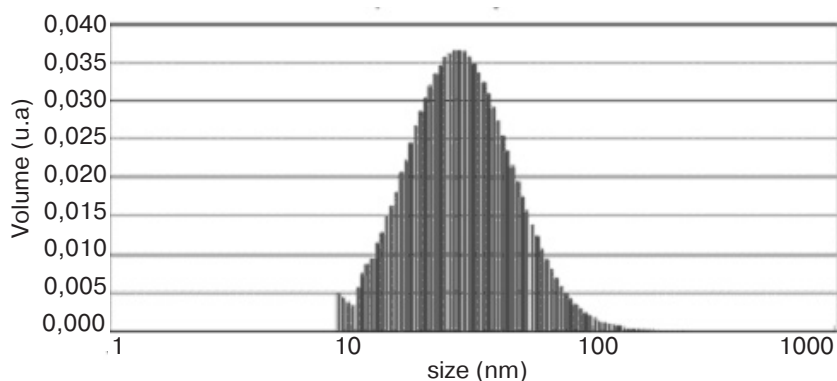
Слід зазначити, що модельні системи *in vitro* хоча й забезпечують швидку та ефективну оцінку токсичності, а також дозволяють зробити методи досліджень автоматизованими та прогнозувати взаємодію з клітинами людини, однак не можуть забезпечити передбачення ризиків застосування їх для наступних поколінь клітин або організмів. Також характеристики поглинання, розподі-

лу, депонування та акумуляції НЧ і НМ в організмі можливі лише при використанні досліджень *in vivo*. За розробленими системами після синтезу і вивчення фізико-хімічних властивостей нового НМ рекомендується проводити оцінку гострої та хронічної токсичності, кумулятивності, гено- і цитотоксичності, імунотоксичності, канцерогенних властивостей, вивчення метаболізму в організмі, а також біотрансформацію у навколишньому середовищі. При цьому основною проблемою нанотоксикології є дозиметрія, яка залежить від часу введення та концентрації використовуваних препаратів, кількості наночастинок та їхніх морфологічних параметрів (розміру, форми, щільності, стану агломерації, а також заряду поверхні) [11].

Нині у токсикологічних дослідженнях *in vivo* все більшої популярності набувають такі тест-об'єкти, як комахи (*Drosophila melanogaster*) і гідробіонти (*Brachydanio rerio*),

Рисунок 2

Дисперсія НЧ золота за об'ємом



проте, їх використання хоча й дозволяє оцінити ризики застосування НМ для наступних поколінь організмів, однак є такі найбільш доцільним у сфері саме екологічної токсикології [2, 3]. У свою чергу, традиційні підходи для оцінки біологічних ефектів НМ в експериментах на лабораторних тваринах не тільки є трудомісткими та витратними, але й не завжди доцільними, оскільки розмір частинок і площа поверхні можуть мати вирішальне значення, при цьому підвищення концентрації НМ може не мати дозозалежного вираження.

Отже, для скорочення обсягів і прискорення досліджень НМ пропонується використовувати шкалу пріоритетів їхнього ступеня небезпеки, за якою вони поділяються на низько-, середньо- та високонебезпечні [12]. Вона встановлюється за результатами попередньої оцінки ступеня небезпеки НМ: на основі масиву наукової інформації враховуються усі відомі на даний час властивості, що впливають на потенційну небезпеку НМ, а саме: геометричні характеристики, фізико-хімічні властивості, взаємодія з біомакромолекулами, вплив на клітини, організм, екологічні характеристики за даними скринінгових тестів на клітинних культурах, бактеріальних культурах, рослинах і гідробіонтах.

Зокрема, для об'єктів з низьким ступенем небезпеки рекомендується проведення тільки певних, критично важливих тестових досліджень. У подальшому можуть бути використані ті ж самі критерії та підходи, що й для «традиційних» аналогів, отриманих без застосування нанотехнологій. Наприклад, оцінка небезпеки НМ без використання тварин може

проводитися на основі моделювання за допомогою методів Монте Карло [13].

Для НМ, які характеризуються середнім ступенем небезпеки, коло запланованих досліджень має бути істотно розширено з метою проведення оцінки впливу на найважливіші функції організму лабораторних тварин. У свою чергу, для НМ з високим ступенем потенційної небезпеки токсикологічна характеристика має здійснюватися у повному обсязі з застосуванням спеціальних видів досліджень (ембріотоксичність, тератогенність, мутагенність, канцерогенність тощо). Можливе проведення експериментів протягом усього життя лабораторних тварин (2-3 роки) або навіть для декількох поколінь [12].

Таким чином, уніфікована токсикологічна характеристика НМ має включати дослідження як *in vitro*, так і *in vivo*, у тому числі експерименти на тваринах, тривалість яких може перевищувати 9-12 місяців. Все це вказує на практичну неможливість охарактеризувати найближчим часом біологічні ефекти усіх важливих НМ через неприйнятні трудовитрати та матеріальні ресурси [14]. Тому при оцінці небезпеки НМ передусім потрібно встановлювати їхній вплив на такі біологічні характеристики, як проникність біомембран, генотоксичність, активність окислювально-відновних процесів, у т.ч. перекисне окислення ліпідів, біотрансформацію та елімінацію з організму [15]. При цьому потрібно враховувати, що

токсичність НМ не може бути виведена порівняно з аналогами у макродисперсній формі або у вигляді суцільних фаз, тому що токсикологічні

властивості НМ є результатом не тільки хімічного складу, але й розмаїття інших особливостей, таких як поверхневі характеристики, розмір, форма, склад, хімічна реактивність тощо;

□ наявні токсикологічні методології засновано на визначенні токсичності речовин щодо масової концентрації, що не є прийнятним для НМ (для яких основними визначальними властивостями можуть бути величини площі поверхні);

□ відсутні стандартизовані індикатори нанотоксичності, які мають обов'язково враховувати внесок таких характеристик, як поверхневі властивості, розмір, форма, склад сполук, хімічна реактивність складових їхніх частинок;

□ відсутні переконливі дані щодо органів-мішеней дії конкретних НМ;

□ методи виявлення, ідентифікації та кількісного визначення НМ в об'єктах довкілля, харчових продуктах та біосередовищах, які могли б достовірно відрізнити їх від хімічних аналогів у макродисперсній формі, мало відпрацьовані.

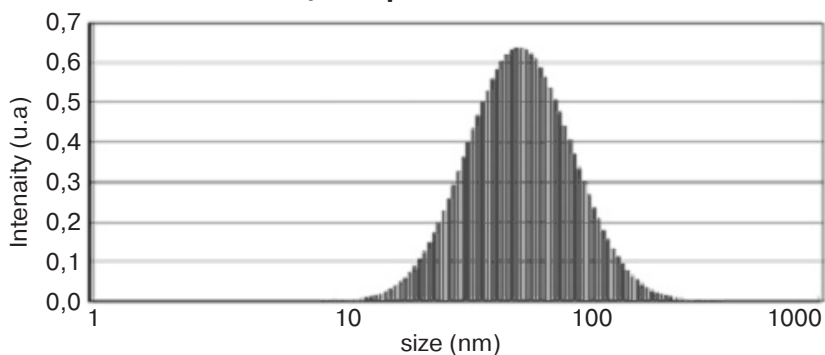
Водночас комплексні дослідження НМ дозволяють уникнути недооцінки біологічних ефектів продуктів нанотехнологій і тим самим забезпечити безпеку населення та захистити довкілля.

Висновки

1. В умовах збільшення обсягів виробництва НМ оцінка їхньої безпеки звичайними класичними токсикологічними методами ускладнюється через неоднозначність отриманих результатів. Значною проблемою в оцінці дії нанопродукції є нестабільність НЧ та непередбачуваність змін їхніх параметрів, характеристик і властивостей, отже й біологічних ефектів. Тому існує нагальна необхідність удосконалення наукових підходів до оцінки токсичності та небезпеки НМ.

2. Альтернативні моделі *in vitro* показали високу чутливість та здатність виявляти токсичний ефект доз, що викликають подібні зміни у тварин лише за умов тривалих експериментів і потребують використання високочутливого спеціального обладнання. Цей факт є надзвичайно важливим, оскільки альтернативні методи дозволяють отримати скринінг-

Рисунок 3
Дисперсія НЧ золота відповідно до інтенсивності сигналу, що випромінюється



гову оцінку токсичності досліджуваних НМ або нанопродукції, що є актуальним в умовах зростаючих обсягів виробництва.

ЛІТЕРАТУРА

1. Проданчук Н.Г., Балан Г.М. Наночастиці диоксида титана и их потенциальный риск для здоровья и окружающей среды. *Современные проблемы токсикологии*. 2011. № 4. С. 11-27.

2. Gorth DJ. Silver nanoparticle toxicity in Drosophila: size does matter. *Int. J. Nanomedicine*. 2011. № 6. P. 343-350.

3. Bai W., Tian W., Zhang Z., He X., Ma Y., Liu N. Effects of copper nanoparticles on the development of zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010. Vol. 29 (9). P. 2044-2052.

4. Hartung T., Bremer S., Casati S., Coecke S., Corvi R., Fortaner S. et al. ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies. *Altern Lab Anim*. 2003. Vol. 31(5). P. 473-81.

5. Пат. № 101308 UA МПК: G01N 33/48, G01N 33/18 Експрес-спосіб визначення токсичності наноматеріалів у розчинах *in vitro* з використанням сперматозоїдів великої рогатої худоби як тест-об'єкта / Демецька О.В., Леоненко Н.С.; ДУ «Інститут медицини праці НАМН України». № заявки у 2014 12531; опубл. 10.09.2015; Бюл. № 17.

6. Tomi S., oki J., Vasiliji S., Ogrinc N., Rudolf R., Pelicon P. et al. Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. *PLoS One*. 2014. Vol. 9 (5). Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>

7. Леоненко Н.С., Леоненко О.В., Демецька О.В., Ткаченко Т.Ю., Гродзюк Г.Я. Дослідження цитотоксичності наночастинок сульфїду кадмію та сульфїду свинцю, стабілізованих органічними сполуками. *Сучасні проблеми токсикології*. 2015. № 3. С. 56-60.

8. Kroll A., Pillukat MH., Hahn D., Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009. Vol. 72 (2). С. 370-377.

9. Leonenko N.S., Demetska O.V., Tkachenko T.Yu., Leonenko O.B. Geometry of nanoparticles as a determinant of their cytotoxicity. *Український журнал з проблем медицини праці*. 2014. № 1. С. 18-22.

10. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. Cytotoxicity of nanoparticles of silver in mammalian cells. *Toxicological Sciences*. 2005. Vol. 3 (2). P. 38-42.

11. Казак А.А., Степанов Е.Г., Гмошинский И.В. Сравнительный анализ современных подходов к оценке рисков, создаваемых искусственными наночастицами и наноматериалами. *Вопросы питания*. 2012. № 4. С. 11-17.

12. Методика классифицирования нанотехнологий и продукции нанопромышленности по степени их потенциальной опасности: метод. рек. МР .2.0016-10. Москва, 2010. 32 с.

13. Соседова Л.М. Роль биомоделирования в оценке воздействия химических факторов окружающей среды на организм человека. *Эл. журн. MEDLINE.RU*. 2015. Т. 16. С. 393-401. Режим доступа: http://www.medline.ru/public/pdf/16_038.pdf

14. Жолдакова З.И., Синицына О.О., Харчевникова Н.В. Общие и специфические аспекты токсических свойств наночастиц и других химических веществ с позиций классической токсикологии. *Гигиена и санитария*. 2008. № 6. С. 12-16.

15. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: метод. указания 1.2.2635-10. Москва, 2010. С. 123 с.

REFERENCES

1. Prodanchuk N.G. and Balan G.M. *Sovremennye problemy toksikologii*. 2011; 4 : 11-27 (in Russian).

2. Gorth DJ. *Int. J. Nanomedicine*. 2011 ; 6 : 343-350.

3. Bai W., Tian W., Zhang Z., He X., Ma Y. and Liu N. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010 ; 29 (9) : 2044-2052.

4. Hartung T., Bremer S., Casati S., Coecke S., Corvi R., Fortaner S. et al. *Altern Lab Anim*. 2003 ; 31(5) : 473-81.

5. Demetzka O.V. and Leonenko N.S. (SI "Institute of Occupational Medicine, NAMS of Ukraine») Patent № 101308 UA IPC: G01N 33/48, G01N 33/18 Ekspres-sposib vyznachennia

toksychnosti nanomaterialiv u rozchynakh in vitro z vykorystanniam spermatozoidiv velykoi rohatoi khudoby yak test-objekta [Patent № 101308 UA IPC: G01N 33/48, G01N 33/18 Express-Method for the Determination of the Toxicity of Nanomaterials in vitro with the Use of Cattle Spermatozoa as a Test-Object]. № u 2014 12531 ; publ. 10.09.2015 ; Bull. № 17 (in Ukrainian).

6. Tomi S., oki J., Vasiliji S., Ogrinc N., Rudolf R., Pelicon P. et al. *PLoS One*. 2014; 9(5). URL : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>

7. Leonenko N.S., Leonenko O.V., Demetska O.V., Tkachenko T.Yu. and Hrodziuk H.Ya. *Suchasni problemy toksykologii*. 2015 ; 3 : 56-60 (in Ukrainian).

8. Kroll A., Pillukat MH., Hahn D. and Schnekenburger J. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009 ; 72 (2) : 370-377.

9. Leonenko N.S., Demetska O.V., Tkachenko T.Yu. and Leonenko O.V. *Ukrainskyi zhurnal z problem medytsyny pratsi*. 2014 ; 1 : 18-22 (in English).

10. Braydich-Stolle L., Hussain S. and Schlager J. *Toxicological Sciences*. 2005 ; 3 (2) : 38-42.

11. Kazak A.A., Stepanov E.G. and Gmshinskiy I.V. *Voprosy pitaniia*. 2012 ; 4 : 11-17 (in Russian).

12. Metodika klassifitsirovaniia nanotekhnologiy i produktsii nanoindustrii po stepeni ikh potentsialnoi opasnosti : metodicheskie rekomendatsii MR 1.2.0016-10 [Methodology of the Classification of Nanotechnology and Production of Nanoindustry by the Level of their Potential Hazard : Methodical Recommendations MP 1.2.0016-10]. Moscow ; 2010 : 32 p. (in Russian).

13. Sosodova L.M. *Elektronnyi zhurnal MEDLINE.RU*. 2015; 16 : 393-401. URL : http://www.medline.ru/public/pdf/16_038.pdf (in Russian).

14. Zholdakova Z.I., Sinitsyna O.O. and Kharchevnikova N.V. *Gigiiena i sanitariia*. 2008 ; 6 : 12-16 (in Russian).

15. Mediko-biologicheskaiia otsenka bezopasnosti nanomaterialov : metodicheskie ukazaniia [Medico-Biological Assessment of Nanomaterials' Safety : Methodical Instructions 1.2.2635-10]. Moscow ; 2010 : 123 p. (in Russian).

Надійшла до редакції 09.01.2017