

УДК 615.9

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖИДКОСТИ
БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО
ИНТРАТРАХЕАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕТАЛЛОКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

Клинова С. В.¹, Сутункова М. П.^{1,2}, Минигалиева И. А.¹, Привалова Л. И.¹,
Рябова Ю. В.¹, Бушуева Т. В.¹

¹ ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья
рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Цитологическое исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа является общепризнанной методикой, применяемой в экспериментальной практике, медицине и ветеринарии. Оценка клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа считается эффективной для дифференциальной диагностики легочных заболеваний, оценки цитотоксического действия вредных агентов. В то же время биохимическим показателям уделяется существенно меньше внимания.

Цель исследования – сравнительная оценка изменений биохимических показателей жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс после однократного воздействия суспензий металлоксидных наночастиц.

Материал и методы. Было проведено острое экспериментальное исследование наночастиц оксидов металлов. Суспензии наночастиц CuO, PbO, CdO, Fe₂O₃, NiO для однократного интратрахеального введения белым аутбредным крысам-самкам в дозе 0,5 мг/животное синтезировали методом лазерной абляции. Контрольным крысам вводили аналогичный объем деионизированной воды (1 мл). Через сутки после введения суспензий у крыс проводилось взятие бронхоальвеолярной лаважной жидкости с последующим центрифугированием и оценкой биохимических показателей надосадочной жидкости.

Результаты. Наибольшее влияние на биохимический состав надосадочной жидкости бронхоальвеолярного лаважа среди исследованных наночастиц оказывал CdO. CuO продемонстрировал несколько меньшие изменения. PbO и NiO не оказывали существенного влияния, а Fe₂O₃ снижал содержание внутриклеточных ферментов в бронхоальвеолярной жидкости.

Вывод. Химическая природа наночастиц определяет выраженность их эффектов при попадании в легкие. Выраженность биохимических изменений не всегда соотносится с данными цитологического исследования жидкости бронхоальвеолярного лаважа, но хорошо дополняет эти данные. Биохимический анализ показателей надосадочной жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс может быть рекомендован как вспомогательный метод оценки цитотоксического действия наночастиц.

Ключевые слова: металлооксидные наночастицы; бронхоальвеолярный лаваж; аланинаминотрансфераза; аспартатаминотрансфераза; лактатдегидрогеназа; амилаза; крысы.

Для цитирования: Клинова С.В., Сутункова М.П., Минигалиева И.А., Привалова Л.И., Рябова Ю.В., Бушуева Т.В. Биохимические изменения жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс после однократного интратрахеального введения металлооксидных наночастиц. Медицина труда и экология человека. 2024; 2: 211-221.

Для корреспонденции: Клинова Светлана Владиславовна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией промышленной токсикологии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. E-mail: s@svklinova.ru.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2024-10214>

BIOCHEMICAL CHANGES IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN RATS AFTER A SINGLE INTRATRACHEAL INJECTION OF METAL OXIDE NANOPARTICLES

Klinova S.V.¹, Sutunkova M.P.^{1,2}, Minigalieva I.A.¹, Privalova L.I.¹, Ryabova Yu.V.¹, Bushueva T.V.¹

¹Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection among Industrial Workers, Yekaterinburg, Russia

²Ural State Medical University of the Russian Health Ministry, Yekaterinburg, Russia

Cytological examination of bronchoalveolar lavage fluid is a generally recognized technique used in experimental practice, medicine, and veterinary medicine. Assessment of the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid is considered effective for differential diagnosis of pulmonary diseases and assessment of cytotoxic effects of harmful agents. At the same time, significantly less attention is paid to its biochemical parameters.

Purpose. Comparative assessment of changes in biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid in rats after a single injection of metal oxide nanoparticle suspensions.

Materials and methods. We conducted an acute toxicity study of metal oxide nanoparticles. Suspensions of CuO, PbO, CdO, Fe₂O₃, and NiO nanoparticles (NPs) were prepared by laser ablation for their subsequent single intratracheal instillation to outbred female albino rats at a dose of 0.5 mg per animal. Control rats were injected a similar volume of deionized water (1 mL). Bronchoalveolar lavage fluid was collected a day after the exposure, centrifuged, and tested for biochemical parameters of the supernatant.

Results. We found that CdO NPs had the greatest effect on the biochemical composition of the supernatant of bronchoalveolar lavage among the nanoparticles under study. CuO NPs induced somewhat smaller changes. PbO and NiO NPs produced no significant effect, and those of Fe₂O₃ reduced the amount of intracellular enzymes in the bronchoalveolar fluid.

Conclusion. The chemical nature of nanoparticles determines the severity of their effects in the lungs. The extent of biochemical changes does not always correlate with the results of cytology testing of bronchoalveolar lavage fluid but complements these data well. A biochemical analysis of the supernatant of bronchoalveolar lavage in rats can be recommended as a supplementary method for assessing cytotoxic effects of nanoparticles.

Keywords: metal oxide nanoparticles; BALF; LDH; ALT; AST; amylase; rats

Citation: Klinova S.V, Sutunkova M.P, Minigalieva I.A., Privalova L.I., Ryabova Yu.V., Bushueva T.V. Biochemical changes in bronchoalveolar lavage fluid in rats after a single intratracheal injection of metal oxide nanoparticles. Occupational health and human ecology. 2024; 2:211-221.

Correspondence: Svetlana V. Klinova, Cand.Sc. (Biology), Head of the Industrial Toxicology Laboratory of the Yekaterinburg Medical Research Center of Rospotrebnadzor, E-mail: s@svklinova.ru

Financing: The study had no financial support.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2024-10214>

Непреднамеренному воздействию наночастиц (НЧ) токсичных металлов подвергаются как работники промышленных предприятий, так и люди, которые проживают в зоне их техногенного влияния. НЧ составляют существенную фракцию аэрозолей, образующихся как побочный продукт многих промышленных технологий (сталеварение, пирометаллургия тяжелых цветных металлов и сплавов, электродуговая сварка, лазерная обработка металлов и др.), загрязняющий производственную и окружающую среду [1]. Природные события (извержение вулканов, пожары и др.) также являются источниками выбросов наночастиц в атмосферу. Частицы нанометрового диапазона являются опасным компонентом вдыхаемого воздуха, т.к. их малые размеры обеспечивают активное проникновение и взаимодействие с различными структурами организма [2]. В современной литературе широко представлены цито- и пульмонотоксические эффекты наночастиц в исследованиях *in vitro* [3-7] и *in vivo* [8-11]. В *in vitro* экспериментах были выявлены увеличение активных форм кислорода (АФК), приводящее к запуску апоптических процессов, снижение жизнеспособности клеток, ингибирование супероксиддисмутазы, снижение содержания глутатиона и

нарушение митохондриальной активности. В исследованиях *in vivo* после воздействия НЧ выявлены воспалительные реакции, апоптоз, фиброзные изменения легочной ткани.

Цитологическое исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа является общепризнанной методикой, применяемой в экспериментальной практике, медицине и ветеринарии [12-16]. Оценка клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа считается эффективной для дифференциальной диагностики легочных заболеваний. Ее применяют и для оценки цитотоксического действия вредных агентов [17].

Для ранжирования токсичности веществ применяют ингаляционное воздействие. Наравне с ним для этой цели полезны интратрахеальные инстилляции [18]. Вместе с тем в большинстве известных нам исследований НЧ мало внимания уделено биохимическому анализу изменений жидкости бронхоальвеолярного лаважа.

В связи с чем представляет интерес изучение биохимических изменений жидкости бронхоальвеолярного лаважа после воздействия наночастиц различной химической природы при интратрахеальном пути введения и ответ на вопрос: может ли оценка биохимических изменений заменить либо лишь дополнить цитологическую оценку жидкости бронхоальвеолярного лаважа?

Целью исследования являлась сравнительная оценка изменений биохимических показателей жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс после однократного воздействия суспензий металлооксидных наночастиц.

Материалы и методы

Синтез наночастиц. Суспензии НЧ синтезировали методом лазерной абляции металлических пластин (99,99 % чистоты, толщиной 1 мм) под слоем деионизированной воды (до 30 мл) в Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» УрФУ. Данный способ позволяет получать суспензии с достаточно узким распределением НЧ по размерам. Известно, что единичные НЧ могут слипаться, но возникающие агрегированные группы не оказывают существенного влияния на общую картину распределения частиц по диаметру. Высокое значение дзета-потенциала (до 42 mV), характеризующее стабильность суспензий, позволило повысить концентрацию суспензии путем частичного испарения воды при 50°C. Дзета-потенциал измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Концентрация суспензий без изменения размера и химической идентичности НЧ составляла 0,5 мг/мл. Средний диаметр НЧ CuO – $21,0 \pm 4,0$ нм, PbO – $23,0 \pm 5,0$ нм, CdO – $65,0 \pm 16,0$ нм, Fe₂O₃ – $18,0 \pm 4,0$ нм, NiO – $16,7 \pm 8,2$ нм.

Экспериментальные животные. В эксперименте использовались белые аутбредные крысы-самки исходной массой тела около 200 г (разброс не превышал 20%) в возрасте около 3 месяцев. Животных содержали при естественном световом режиме в помещении вивария (с наличием барьерной среды – воздушный шлюз), при стандартных и контролируемых условиях микроклимата в соответствии с нормативными документами. Для кормления крыс использовался полнорационный комбикорм для лабораторных животных, сбалансированный по витаминному и минеральному составу, изготовленный в соответствии с ГОСТ Р34566-2019. Режим питания и питьевой режим организован в свободном доступе в соответствии с ГОСТ Р51232-98. Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с «International guiding principles for biomedical research involving animals» от CIOMS и ICLAS (2012).

Работа одобрена независимым Локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (протокол № 2 от 20.04.2020).

Оценка биохимических показателей жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ). Под эфирным рауш-наркозом интратрахеально крысам вводили 1 мл суспензии НЧ в дозе 0,5 мг/животное. Контрольным животным – 1 мл деионизированной воды. Через сутки после введения НЧ у крыс под гексеналовым наркозом производился забор БАЛЖ. Затем жидкость центрифугировалась в течение 4 мин. при 1000 об/мин. (200g) и отбирался супернатант. В нем определяли уровень альбуминов, глюкозы, мочевины, активность амилазы, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы (АСТ, АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) с использованием автоматического анализатора Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics GmbH, Германия) с соответствующими тест-наборами.

Статистическая обработка. Значимость межгрупповых различий определяли, используя *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Данные в статье приведены в формате: среднее ± стандартная ошибка.

Результаты

Изменения биохимических показателей БАЛЖ животных после однократного воздействия суспензий металлооксидных наночастиц представлены в таблице.

Таблица. Биохимические изменения жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс после однократного введения металлоксидных наночастиц ($\bar{X} \pm Sx$)

Table. Biochemical changes in the bronchoalveolar lavage fluid of rats after a single administration of metal oxide nanoparticles ($\bar{X} \pm Sx$)

	Контроль	CuO	CdO	PbO	Fe ₂ O ₃	NiO
Альбумин, г/л	17,74 ± 1,50	22,95 ± 7,49	21,48 ± 8,15	26,02 ± 7,63	14,89 ± 1,59	17,41 ± 4,30
Глюкоза, ммоль/л	0,05 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,21 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Мочевина, ммоль/л	0,23 ± 0,03	0,40 ± 0,06 *	0,44 ± 0,11	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,27 ± 0,03
Амилаза, Е/л	3,89 ± 0,68	110,14 ± 37,46 *	68,01 ± 23,52 *	6,07 ± 1,75	3,58 ± 0,54	7,61 ± 3,75
АЛТ, Е/л	2,06 ± 0,78	8,51 ± 4,43	10,39 ± 3,84 *	1,71 ± 0,51	0,63 ± 0,18	0,80 ± 0,23
АСТ, Е/л	11,17 ± 1,91	28,82 ± 9,22	34,86 ± 10,66 *	11,38 ± 1,07	4,30 ± 1,04 *	9,39 ± 3,09
ГГТП, Е/л	1,64 ± 0,50	3,34 ± 0,94	6,61 ± 2,49	2,90 ± 0,58	0,69 ± 0,31	3,41 ± 1,73
ЛДГ, Е/л	43,40 ± 6,36	107,90 ± 24,23 *	173,90 ± 67,15	46,20 ± 8,02	12,40 ± 3,42 *	45,50 ± 23,07
ЩФ, Е/л	27,97 ± 4,44	19,29 ± 3,32	29,35 ± 3,72	41,91 ± 5,52	9,63 ± 3,02 *	20,73 ± 6,05

Примечание: АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспаратаминотрансфераза, ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ЩФ – щелочная фосфатаза; знаком * обозначены статистически значимые отличия от контрольной группы (по *t*-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони)

Note: ALT – alanine aminotransferase, AST – aspartate aminotransferase, GGTP – gamma-glutamyl transpeptidase, LDH – lactate dehydrogenase, ALP – alkaline phosphatase; * indicates statistically significant differences from the control group (according to Student's *t*-test with Bonferroni correction)

Ни один из исследованных видов НЧ не привел к статистически значимому изменению в сравнении с контрольной группой уровней альбумина и глюкозы в БАЛЖ, хотя НЧ CdO приводили к почти 4-кратному увеличению глюкозы.

После воздействия НЧ CuO обнаружено статистически значимое увеличение мочевины в БАЛЖ крыс в 1,7 раза ($p < 0,05$). Еще большее в абсолютном значении, но статистически незначимое увеличение показано после введения НЧ CdO.

Показано увеличение уровня амилазы в БАЛЖ после воздействия всех исследованных НЧ, за исключением Fe₂O₃. Увеличение уровня амилазы после

воздействия НЧ CuO и НЧ CdO было статистически значимым в 28,3 и 17,5 раза соответственно ($p < 0,05$).

Активность АЛТ возростала после воздействия НЧ CdO в 5 раз ($p < 0,05$) и после НЧ CuO – в 4,1 раза. Влияние других исследованных наночастиц приводило к тенденции к снижению активности АЛТ. Практически ту же направленность изменений наблюдали и по показателю активности АСТ: она возросла после воздействия НЧ CdO в 3,1 раза ($p < 0,05$), после НЧ CuO – в 2,6 раза, практически не изменилась после НЧ PbO и НЧ NiO, а после НЧ Fe₂O₃ снизилась в 2,6 раза ($p < 0,05$). Картина изменений активности ЛДГ сходна с изменениями активности АСТ: увеличение после воздействия НЧ CuO в 2,5 раза ($p < 0,05$) и после НЧ CdO – в 4 раза, снижение после НЧ Fe₂O₃ в 3,5 раза ($p < 0,05$).

Активность ЩФ была значимо снижена после воздействия НЧ Fe₂O₃ в 2,9 раза ($p < 0,05$).

Обсуждение

Значимых изменений уровней альбумина и глюкозы не было выявлено, вероятно, потому, что вариабельность этих показателей в нашем эксперименте была достаточно высока. Хотя ранее при изучении метаболитов БАЛЖ после воздействия НЧ ZnO было показано, что 35 нм частицы не приводят к значимым изменениям энергетического метаболизма, а 250 нм частицы снижали уровень глюкозы, из чего авторы сделали вывод, что НЧ ZnO могут нарушать цикл трикарбоновых кислот и увеличивать преобразование глюкозы в лактат или аланин в легких [19].

ГГТП – мембраносвязанный фермент, который участвует в переносе глутамильной части глутатиона к другим аминокислотам и дипептидам [20]. В наших исследованиях ГГТП не проявил выраженной чувствительности к введению наночастиц. Вероятно, естественная вариабельность этого фермента в БАЛЖ высока, из-за чего большой разброс данных не позволил выявить значимые различия.

Внутриклеточный гликолитический фермент ЛДГ используют для анализа целостности клеточной мембраны [21-23]. Это важный маркер клеточной деструкции. Высокая степень разрушения мембран клеток происходила после воздействия НЧ CuO и НЧ CdO (таблица), что подтверждается результатами цитологических исследований, представленных ранее, где было показано, что НЧ CuO и НЧ CdO оказывали наибольшее цитотоксическое действие среди изученных НЧ [24]. Другие исследованные нами НЧ не приводили к значимому увеличению ЛДГ. В то же время НЧ Fe₂O₃ статистически значимо снижали этот показатель.

Помимо ЛДГ после воздействия НЧ Fe_2O_3 статистически значимо снижались и другие внутриклеточные ферменты – АСТ, ЩФ. Снижение внутриклеточных ферментов в супернатанте БАЛЖ может указывать на некоторое положительное действие НЧ Fe_2O_3 в исследованной концентрации, вероятно, за счет быстрого проникновения в клетки и высокой скорости растворения, которая была выявлена ранее [25]. К тому же было показано, что НЧ Fe_2O_3 образуют агломераты в цитозоле клетки [26] и, постепенно растворяясь, могут влиять на внутриклеточный обмен железом. В исследовании Tolliver с соавторами [27] обнаружено сохранение выживаемости клеточной культуры A549 после добавления НЧ Fe_2O_3 .

Воздействие НЧ CuO и CdO вело к повышению АСТ и АЛТ в надосадочной жидкости. Эти два фермента также являются внутриклеточными (в основном находятся в цитозоле) [28], а значит, также указывают на повреждение клеток легких.

Увеличение амилазы наблюдали после воздействия этих же НЧ CuO и НЧ CdO , что также, вероятно, связано с большим притоком клеток в легкие и их разрушением, показанным ранее [24]. При разрушении клеток выделяются фиброгенные факторы, которые приводят к активации роста соединительной ткани. Увеличение амилазы в БАЛЖ показано при воспалительных и онкологических поражениях легких [29-31], а также при обострении хронической обструктивной болезни легких [32] и аспирационной пневмонии [33]. Все перечисленные процессы сопровождаются воспалением и пролиферацией клеток, будь то опухолевые клетки или фибробласты. Мы предполагаем, что именно активный рост соединительной ткани ведет к росту амилазы в БАЛЖ и может служить характеристикой не цитотоксичности, но фиброгенности изученных частиц.

Следовательно, повышение в супернатанте БАЛЖ внутриклеточных ферментов может указывать на цитотоксическое и фиброгенное действие НЧ. В проведенном эксперименте наибольшее влияние на биохимический состав БАЛЖ оказывали НЧ CdO . НЧ CuO продемонстрировали несколько меньшие изменения. НЧ PbO и НЧ NiO не оказывали существенного влияния на биохимические изменения супернатанта БАЛЖ, а НЧ Fe_2O_3 снижали содержание внутриклеточных ферментов в супернатанте БАЛЖ. При этом ранее было показано, что наибольшую цитотоксичность из исследованных НЧ проявляют НЧ CuO [24]. В остальном выводы при анализе биохимических показателей супернатанта и цитологических показателей БАЛЖ сходны.

Выводы

Химическая природа наночастиц определяет выраженность их эффектов при попадании в легкие, потому как было показано, что при одной и той же исследуемой дозе металлоксидных наночастиц различной химической природы выраженность нарушений от их вредного токсического действия различается.

Биохимический анализ показателей жидкости бронхоальвеолярного лаважа крыс может быть рекомендован как вспомогательный метод оценки цитотоксического и фиброгенного действия наночастиц, поскольку *интенсивность изменений биохимического состава супернатанта БАЛЖ не всегда совпадает с данными цитологического исследования БАЛЖ, но хорошо их дополняет.*

Благодарность. Авторы выражают благодарность коллективу Уральского центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина и лично директору УЦКП СН, профессору, д.ф-м.н. Шуру Владимиру Яковлевичу за синтез суспензий исследованных наночастиц заданной характеристики на базе УЦКП СН УрФУ.

Список литературы/References:

1. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E. et al. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int J Mol Sci.* 2014, 15(7):12379-406. DOI: 10.3390/ijms150712379.
2. Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Berestovoy M., Karaulov A., Nabiev I. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2018; 13(1):44. DOI: 10.1186/s11671-018-2457-x.
3. Wu Y., Wang M., Luo S., Gu Y., Nie D., Xu Z. et al. Comparative toxic effects of manufactured nanoparticles and atmospheric particulate matter in human lung epithelial cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 18 (1): 22. DOI: 10.3390/ijerph18010022.
4. Xie S., Zhu J., Yang D., Xu Y., Zhu J., He D. Low concentrations of zinc oxide nanoparticles cause severe cytotoxicity through increased intracellular reactive oxygen species. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2021; 17 (12): 2420-2432. DOI: 10.1166/jbn.2021.3209.
5. Lai X., Wei Y., Zhao H., Chen S., Bu X., Lu F. et al. The effect of Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells. *J. Appl. Toxicol.* 2015; 35 (6): 651-64. DOI: 10.1002/jat.3128.
6. Zhang X., Zhang H., Liang X., Zhang J., Tao W., Zhu X. et al. Iron oxide nanoparticles induce autophagosome accumulation through multiple mechanisms: lysosome impairment, mitochondrial damage, and ER stress. *Mol. Pharmaceutics.* 2016; 13 (7): 2578–2587. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00405.

7. Lai X., Zhao H., Zhang Y., Guo K., Xu Y., Chen S. et al. Intranasal delivery of copper oxide nanoparticles induces pulmonary toxicity and fibrosis in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 4499. DOI: 10.1038/s41598-018-22556-7.
8. Chen A., Feng X., Sun T., Zhang Y., An S., Shao L. Evaluation of the effect of time on the distribution of zinc oxide nanoparticles in tissues of rats and mice: a systematic review. *IET nanobiotechnology.* 2016,10(3):97–106. DOI: 10.1049/iet-nbt.2015.0006
9. Dumková J., Smutná T., Vrlíková L., Le Coustumer P., Večeřa Z., Dočekal B. et al. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part. Fibre Toxicol.* 2017; 14: 55. DOI: 10.1186/s12989-017-0236-y.
10. Sutunkova M.P., Solovyeva S.N., Minigalieva I.A., Gurvich V.B., Valamina I.E., Makeyev O.H. et al. Toxic effects of low-level long-term inhalation exposures of rats to nickel oxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (7): 1778. DOI: 10.3390/ijms20071778.
11. Liu N., Guan Y., Zhou C., Wang Y., Ma Z., Yao S. Pulmonary and systemic toxicity in a rat model of pulmonary alveolar proteinosis induced by indium-tin oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* 2022; 17: 713-731. DOI: 10.2147/IJN.S338955.
12. Vedder V., Schildgen V., Lüsebrink J., Tillmann R.L., Domscheit B., Windisch W. et al. Differential cytology profiles in bronchoalveolar lavage (BAL) in COVID-19 patients: A descriptive observation and comparison with other corona viruses, Influenza virus, Haemophilus influenzae, and Pneumocystis jirovecii. *Medicine (Baltimore).* 2021,100(1):e24256. DOI: 10.1097/MD.00000000000024256.
13. Gregson A.L., Hoji A., Saggat R., Ross D.J., Kubak B.M., Jamieson B.D. et al. Bronchoalveolar immunologic profile of acute human lung transplant allograft rejection. *Transplantation.* 2008,85(7):1056-9. DOI: 10.1097/TP.0b013e318169bd85.
14. Davis K.U., Sheats M.K. Bronchoalveolar lavage cytology characteristics and seasonal changes in a herd of pastured teaching horses. *Front Vet Sci.* 2019,6:74. DOI: 10.3389/fvets.2019.00074.
15. Pavot V., Prost C., Dubost-Martin G., Thibault-Duprey K., Ramery E. Bronchoalveolar lavage fluid cytology in healthy Cynomolgus Macaques. *Front Vet Sci.* 2021,8:679248. DOI: 10.3389/fvets.2021.679248.
16. Guan Y., Liu N., Yu Y., Zhou Q., Chang M., Wang Y., Yao S. Pathological comparison of rat pulmonary models induced by silica nanoparticles and indium-tin oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2022,17:4277-4292. DOI: 10.2147/IJN.S380259.
17. Huang Y.W., Cambre M., Lee H.J. The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (12): 2702. DOI: 10.3390/ijms18122702.
18. Morimoto Y., Izumi H., Yoshiura Y., Tomonaga T., Lee B.W., Okada T. et al. Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2016; 10(5): 607-18. DOI: 10.3109/17435390.2015.1104740
19. Lee S.H., Wang T.Y., Hong J.H., Cheng T.J., Lin C.Y. NMR-based metabolomics to determine acute inhalation effects of nano- and fine-sized ZnO particles in the rat lung. *Nanotoxicology.* 2016,10(7):924-934. DOI: 10.3109/17435390.2016.1144825.

20. Snow S., Kodavanti, U.P. Chapter 13: Respiratory toxicity biomarkers. In: Biomarkers in Toxicology, Edition 2. Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands, 2019, 229-250. DOI: 10.1016/B978-0-12-814655-2.00013-X
21. Kwon J.T., Kim Y., Choi S., Yoon B.L., Kim H.S., Shim I. et al. Pulmonary toxicity and proteomic analysis in bronchoalveolar lavage fluids and lungs of rats exposed to copper oxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23 (21): 13265. DOI: 10.3390/ijms232113265.
22. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran. Biomed. J.* 2016,20(1):1-11. DOI: 10.7508/ibj.2016.01.001.
23. Yang W., Wang L., Mettenbrink E.M., DeAngelis P.L., Wilhelm S. Nanoparticle Toxicology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2021,61:269-289. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338.
24. Sutunkova M.P., Klinova S.V., Ryabova Y.V., Tazhigulova A.V., Minigalieva I.A., Shabardina L.V. et al. Comparative evaluation of the cytotoxic effects of metal oxide and metalloid oxide nanoparticles: an experimental study. *Int J Mol Sci.* 2023,24(9):8383. DOI: 10.3390/ijms24098383
25. Sutunkova M.P., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Konysheva L.K., Shur V.Y. et al. On the contribution of the phagocytosis and the solubilization to the iron oxide nanoparticles retention in and elimination from lungs under long-term inhalation exposure. *Toxicology.* 2016,363-364:19-28. DOI: 10.1016/j.tox.2016.07.006.
26. Lai X., Wei Y., Zhao H., Chen S., Bu X., Lu F. et al. The effect of Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells. *J Appl Toxicol.* 2015,35(6):651-64. DOI: 10.1002/jat.3128.
27. Tolliver L.M., Holl N.J., Hou F.Y.S., Lee H.J., Cambre M.H., Huang Y.W. Differential cytotoxicity induced by transition metal oxide nanoparticles is a function of cell killing and suppression of cell proliferation. *Int J Mol Sci.* 2020,21(5):1731. DOI: 10.3390/ijms21051731.
28. Faqi A.A. Comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development. Ed. 2. Academic Press, 2017, 971 p. DOI: 10.1016/C2015-0-00147-2
29. Otsuki M., Yuu H., Maeda M., Saeki S., Yamasaki T., Baba S. Amylase in the lung. *Cancer.* 1977,39:1656-1663. DOI: 10.1002/1097-0142(197704)39:4<1656::aid-cnrcr2820390440>3.0.co;2-8
30. Wang H., Wu Q. A case of amylase-producing small cell lung cancer. *Clin, Biochem.* 2016, 49(7-8):613-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.01.011
31. Berk J.E., Shimamura J., Fridhandler L. Amylase changes in disorders of the lung. *Gastroenterology.* 1978, 74(6), 1313-17.
32. Fijačko V., Labor M., Fijačko M., Škrinjarić-Cincar S., Labor S., Dumbović Dubravčić I. et al. Predictors of short-term LAMA ineffectiveness in treatment naïve patients with moderate to severe COPD. *Wien Klin Wochenschr.* 2018,130(7-8):247-258. DOI: 10.1007/s00508-017-1307-7
33. Suzuki T., Saitou M., Utano Y., Utano K., Niitsuma K. Bronchoalveolar lavage amylase levels can be a biomarker of aspiration pneumonia. *Pulmonology.* 2022, S2531-0437(22)00104-0. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2022.04.003