

Сравнительная характеристика различных волокнистых материалов в экспериментах *in vitro*

Гюзель Абдулхалимовна Тимербулатова^{1,2*}, Павел Дмитриевич Дунаев¹,
Айрат Маратович Димиев³, Гульназ Фаезовна Габидинова¹,
Наиль Назимович Хаертдинов³, Равиль Фаридович Фахруллин³,
Сергей Васильевич Бойчук¹, Лилия Минвагизовна Фатхутдинова¹

¹Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

²Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан, г. Казань, Россия;

³Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, Россия

Реферат

Цель. Сравнительная оценка воздействия волокнистых материалов на клеточных культурах RAW264.7 и BEAS-2B.

Методы. На двух клеточных линиях — макрофагах RAW 264.7 и клетках человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B — оценивали воздействие различных волокнистых материалов: неочищенных одностенных углеродных нанотрубок двух типов (ОУНТ-1 и ОУНТ-2), различавшихся длиной и другими морфологическими характеристиками, и хризотил-асбеста в качестве положительного контроля. Диапазон концентраций исследуемых веществ для внесения в клетки был выбран с учётом содержания ОУНТ в воздухе рабочей зоны и последующего моделирования депонирования ОУНТ в дыхательных путях человека. Суспензии исследуемых материалов были подготовлены на основе клеточных культуральных сред методом ультразвуковой соникации. Оценку цитотоксичности после 48-часового культивирования клеток проводили с помощью коллометрического MTS-теста. Методом иммуноблоттинга оценивали уровень экспрессии белков-маркёров апоптоза с использованием соответствующих моноклональных антител. Визуализация ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста в культурах клеток BEAS-2B проведена методом улучшенной темнопольной микроскопии.

Результаты. По данным темнопольной микроскопии все изученные волокнистые материалы обнаружены на поверхности или в цитоплазме клеток. ОУНТ и хризотил-асбест не оказывали прямого цитотоксического действия в MTS-тесте и не вызывали апоптоз по результатам вестерн-блота в клеточных культурах макрофагов RAW264.7 и бронхиального эпителия BEAS-2B. В проявивших большую чувствительность клетках бронхиального эпителия (BEAS-2B) выявлено небольшое повышение экспрессии сигнального апоптического белка ПАРП [поли-(АДФ-рибозил)-полимераза], более выраженное для более коротких ОУНТ-2.

Вывод. Оба типа одностенных углеродных нанотрубок, несмотря на различия в морфологических характеристиках, демонстрировали схожие эффекты в экспериментах *in vitro*; этот результат при его дальнейшей верификации может иметь важное практическое применение при обосновании подходов к определению критериев безопасности одностенных углеродных нанотрубок как однотипного класса наноматериалов.

Ключевые слова: одностенные углеродные нанотрубки, макрофаги RAW264.7, клетки бронхиального эпителия BEAS-2B, темнопольная микроскопия.

Для цитирования: Тимербулатова Г.А., Дунаев П.Д., Димиев А.М., Габидинова Г.Ф., Хаертдинов Н.Н., Фахруллин Р.Ф., Бойчук С.В., Фатхутдинова Л.М. Сравнительная характеристика различных волокнистых материалов в экспериментах *in vitro*. *Казанский мед. ж.* 2021; 102 (4): 501–509. DOI: 10.17816/KMJ2021-501.

Comparative characteristics of various fibrous materials in *in vitro* experiments

G.A. Timerbulatova^{1,2}, P.D. Dunaev¹, A.M. Dimiev³, G.F. Gabidinova¹, N.N. Khaertdinov⁴, R.F. Fakhrullin⁴, S.V. Boichuk¹, L.M. Fatkhutdinova¹

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

²Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russia;

³Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract

Aim. Comparative assessment of the effect of fibrous materials on cell cultures RAW264.7 and BEAS-2B.

Methods. The effects of various fibrous materials — single-walled carbon nanotubes of two types (SWCNT-1 and SWCNT-2), differing in morphological characteristics, and chrysotile asbestos as a positive control — was assessed on two cell lines macrophages RAW 264.7 and human bronchial epithelium BEAS-2B cells. The studied materials' concentration range for experiments on cells was selected taking into account the SWCNT content in the air of the working area and the subsequent modeling of SWCNT deposition in the human respiratory tract. Suspensions of the studied materials were prepared based on cell culture media by ultrasonication. Cytotoxicity assessment after 48 hours of incubation was performed by using the MTS colorimetric assay. The expression level of apoptosis markers was assessed by immunoblotting using the corresponding monoclonal antibodies. Visualization of SWCNT-1, SWCNT-2 and chrysotile asbestos in BEAS-2B cell cultures was carried out by improved dark-field microscopy.

Results. According to dark-field microscopy, all the studied fibrous materials were found on the surface or cytoplasm of the cells. SWCNT and chrysotile asbestos did not have a direct cytotoxic effect in the MTS assay and did not induce apoptosis according to the results of Western blotting in cell cultures of RAW264.7 macrophages and BEAS-2B bronchial epithelium. In the cells of the bronchial epithelium (BEAS-2B) that showed greater sensitivity, a slight increase in the expression of pro-apoptotic protein PARP, which was more pronounced for shorter SWCNT-2, was revealed.

Conclusion. Both types of SWCNTs, despite the differences in morphological characteristics, demonstrated similar effects in *in vitro* experiments; this result, with its further verification, can have an important practical application in justifying approaches to determining the safety criteria for single-walled carbon nanotubes as a class of nanomaterials of the same type.

Keywords: single-walled carbon nanotubes, RAW264.7 macrophages, bronchial epithelial BEAS-2B cells, dark-field microscopy.

For citation: Timerbulatova G.A., Dunaev P.D., Dimiev A.M., Gabidinova G.F., Khaertdinov N.N., Fakhrullin R.F., Boichuk S.V., Fatkhutdinova L.M. Comparative characteristics of various fibrous materials in *in vitro* experiments. *Kazan Medical Journal*. 2021; 102 (4): 501–509. DOI: 10.17816/KMJ2021-501.

Актуальность. Уникальные физические и химические свойства одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) позволяют использовать их во многих областях, включая композитные материалы, строительство, нанoeлектронику, нанобиотехнологию, разработку бионаносенсоров [1–3]. Глобальный рынок наноматериалов, в том числе ОУНТ, растёт с каждым годом [4]. Переход к крупномасштабному производству ОУНТ определяет необходимость оценки возможных медико-биологических эффектов, включая изучение влияния этих материалов на здоровье человека, в том числе в условиях производства [5]. При этом понимание того, как свойства новых наноматериалов определяют их взаимодействие с клетками, тканями и органами, становится первостепенной задачей, которую необходимо решать для обоснования подходов к безопасному использованию [6].

Учитывая такие преимущества экспериментов *in vitro*, как гуманность (отсутствие экспе-

риментов с участием животных), сравнительно низкая стоимость, высокая пропускная способность, эти исследования имеют значительный потенциал при оценке токсичности, в том числе наноматериалов [7].

Большинство исследований ОУНТ посвящено изучению токсического действия на дыхательную систему как наиболее вероятный орган-мишень при ингаляционном пути поступления вещества в организм человека. В экспериментах *in vitro* влияние на дыхательную систему моделируют чаще всего на культурах клеток бронхиального эпителия BEAS-2B и альвеолярных эпителиальных клеток человека A549. Результаты исследований показали снижение жизнеспособности клеток BEAS-2B и признаки окислительного стресса при экспозиции ОУНТ [8–10]. С другой стороны, исследователи сообщили об отсутствии цитотоксичности при инкубации линии альвеолярных эпителиальных клеток человека A549 с ОУНТ [11–14].

Изучение эффектов экспозиции к ОУНТ на макрофагах MDM [15] и HMDM [16] не выявило прямого цитотоксического действия [15], но было отмечено подавление процесса поглощения апоптических клеток исследуемыми макрофагами [16]. На альвеолярных макрофагах RAW 264.7 [10, 16–19] воздействие ОУНТ показало признаки повышенной токсичности [10, 16, 18, 19], синтез трансформирующего фактора роста β [10, 17], дозозависимое снижение жизнеспособности клеток [10, 17], а также способность ОУНТ к проникновению через клеточные мембраны в ядра клеток [20].

Противоречивые результаты могут быть обусловлены не только различиями в условиях испытаний, но и физико-химическими характеристиками изучавшихся ОУНТ, что обосновывает необходимость сравнительного изучения биологических эффектов разных типов ОУНТ.

В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка эффектов ОУНТ разных типов. Дозы, выбранные для исследования, были подобраны, в том числе, с учётом реальных производственных экспозиций. В качестве контрольного материала (положительный контроль) использован хризотил-асбест, выбор которого был обусловлен морфологическими характеристиками хризотил-асбеста, имеющего схожую с ОУНТ волокнистую структуру.

Материал и методы исследования. Учитываем преимущественно ингаляционный путь поступления ОУНТ [21], для исследования были выбраны клетки RAW 264.7, представляющие собой трансформированные мышинные макрофаги, являющиеся клетками иммунной системы, в том числе дыхательных путей, а также иммортализованные клетки нормального человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B, представляющие собой клетки нижних дыхательных путей.

В качестве материала для исследования использовали не очищенные от металлических примесей ОУНТ разных типов (ОУНТ-1 и ОУНТ-2), различающиеся по морфологическим характеристикам. ОУНТ-2 были короче и тоньше (длина ~ 100 – 1000 нм против >5 мкм для ОУНТ-1, средний диаметр $\sim 0,8$ – $1,2$ нм против $1,6$ нм для ОУНТ-1), с большей удельной площадью поверхности (~ 400 – 1000 м²/г против 410 м²/г). В эксперименте использован также образец измельчённого хризотил-асбеста Баженовского месторождения (Средний Урал) с соотношением длины к ширине 3:1, длиной >5 мкм (предоставлен Екатеринбургским медицинским научным центром профилактики и охраны здоровья рабочих промышленных предприятий).

Диапазон концентраций исследуемых материалов был подобран с учётом предварительных данных о концентрации и дисперсности ОУНТ в воздухе рабочей зоны предприятия-производителя ОУНТ-1. Концентрации ОУНТ-1 в воздухе рабочей зоны на различных производственных участках предприятия-производителя были значительно ниже референтного уровня, предложенного Национальным институтом охраны и медицины труда США [22] — 1 мкг/м³ (REL NIOSH) и широко применяемого для ориентировочной оценки производственного риска в условиях отсутствия национальных рекомендаций.

Распределение частиц ОУНТ-1 по размерам изучали при помощи просвечивающей электронной микроскопии фильтров из смешанных эфиров целлюлозы, на которые были отобраны пробы воздуха (не менее 210 л на скорости 2–4 л/мин) на нескольких рабочих местах предприятия, где по предварительным данным возможен контакт с аэрозолем ОУНТ. Просвечивающая электронная микроскопия была проведена на микроскопе Carl Zeiss Libra 120 (Германия) с использованием компьютерной программы Carl Zeiss AxioVision. По данным просвечивающей электронной микроскопии размер агломератов ОУНТ находился в диапазоне от 0,3 до 3 мкм.

Для расчёта количества частиц и массы осаждаемой фракции (депонирования) аэрозоля ОУНТ в дыхательных путях человека применяли модель MPPD (от англ. Multiple-Path Particle Dosimetry) [23]. При расчёте депонирования был использован консервативный сценарий, при котором концентрация ОУНТ в воздухе рабочей зоны была принята 1 мкг/м³, что соответствовало REL NIOSH и многократно превышало уровни ОУНТ-1 в воздухе рабочих мест. Также в качестве входных параметров модели были использованы данные по дисперсному составу аэрозоля и продолжительности воздействия — 8 ч, что соответствует продолжительности рабочей смены. При расчёте депонированных фракций аэрозоля в лёгких человека была использована модель Yeh-Schum Symmetric [23].

Полученные значения по доле и количеству частиц, осевших в дыхательных путях человека, были использованы для расчёта депонированной дозы ОУНТ в лёгких человека за 25 лет работы (по 250 смен в год) с последующим пересчётом на 1 см² альвеолярного эпителия человека, расчётом необходимых поверхностных доз и концентраций (с учётом площади и объёма планшетной лунки) для внесения в клеточ-

ные культуры. Расчётная депонированная доза в лёгких составила 2000 мкг, что соответствовало концентрации 0,0006 мкг/мл. С учётом собственных расчётов и данных из литературных источников [8–20] диапазон концентраций для исследования составил 0,0001–10 мкг/мл, включая широкий набор нетоксичных и потенциально токсичных доз ОУНТ.

Суспензии исследуемых материалов были подготовлены на основе культуральных сред DMEM (Sigma-Aldrich, D1145-500ML, Великобритания) и Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM; Sigma-Aldrich, 511K-500, Германия). Выбор культуральных сред для диспергирования ОУНТ и хризотил-асбеста был обоснован используемыми в исследовании клеточными линиями RAW 264.7 (American Type Culture Collection, США) и BEAS-2B (Cell Applications, Inc., США).

Приготовление суспензий проводили в асептических условиях (в биобоксе) методом ультразвуковой обработки с использованием аппарата Sonic Vibra Cell Sonicator (Sonics & Materials, США) при следующих параметрах работы: 750 Вт, 20 кГц, 40% амплитуда, пульс 5/6, время 30 мин. Изначально были подготовлены суспензии ОУНТ в исходной концентрации 0,1 мг/мл, из которых получали необходимые разведения для экспериментов. Контроль качества полученной дисперсии осуществляли методом динамического светорассеяния при помощи анализатора Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания), оценивали распределение размеров агломератов в суспензиях.

В процессе размора, упаковки или обработки материалы (ОУНТ, хризотил-асбест) могут быть загрязнены бактериальными эндотоксинами (липополисахаридами — основными структурными компонентами наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий), вызывающими различные побочные реакции при воздействии на биологические объекты [24]. По этой причине приготовленные суспензии дополнительно были протестированы на наличие бактериального эндотоксина с помощью ЛАЛ-реактива (Endosafe КТА, серия К2422L, Charles River Endosafe, США) с использованием турбидиметрического кинетического метода [25]. Более подробно этапы подготовки и оценки полученной суспензии описаны в нашем предыдущем исследовании [26].

Культивирование клеточных линий проводили в CO₂-инкубаторе (LAMSYSTEMS ИЛМ-170, Миасс, Россия) при стандартных условиях: 37 °С, 5% CO₂. Клетки засеивали в соот-

ветствующую культуральную среду (макрофаги RAW 264.7 в среду DMEM, клетки бронхиального эпителия BEAS-2B в среду BEGM) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки — 15% для среды DMEM и 5% для среды BEGM, а также антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамин (ПАНЭКО, Россия).

Через 48 ч после внесения суспензий исследуемых материалов проводили оценку цитотоксичности и апоптоза на клетках RAW 264.7 и BEAS-2B, а также визуализацию ОУНТ и хризотил-асбеста на клетках BEAS-2B.

Оценку цитотоксичности выполняли с помощью коллометрического MTS-теста (Promega, США), основанного на оценке метаболической активности клеток, отражающей их жизнеспособность [27]. Сущность данной методики заключается в том, что живые клетки с нормальным метаболизмом синтезируют НАДФ-Н-зависимые¹ клеточные оксидоредуктазные ферменты, способные восстанавливать тетразолиевый краситель в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание, а ослабленные или погибшие клетки такой способностью не обладают. Величина оптической плотности пропорциональна количеству живых клеток в лунках.

В эксперименте исследовали 18 концентраций в диапазоне от 0,0001 до 10 мкг/мл. Оценку результатов MTS-теста проводили путём сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Для достижения статистической достоверности каждую концентрацию материала исследовали в трёх повторностях. Измерение оптической плотности осуществляли с помощью планшетного фотокориметра Multiskan (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм.

Методом иммуноблоттинга (вестерн-блот) оценивали уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза. Клеточные экстракты получали посредством лизиса клеток в радиоиммунопреципитационном буфере с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Образцы (30 мкг) разделяли в 4–12% полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану посредством влажного трансфера. Инкубацию с первичными моноклональными антителами ПАРП² (Life Technologies, США) и расщеплённой формой каспазы-3 (Cl.Caspase-3, Cell Signaling, США) проводили при 4 °С в течение 16 ч.

¹ НАДФ-Н — восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат.

² ПАРП — поли-(АДФ-рибозил)-полимераза.

В качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах использовали антитела к актину (GenScript Biotech, США). Вторичные антитела (кроличьи или мышинные), конъюгированные с пероксидазой (Santa Cruz, Biotechnology, США), добавляли в концентрации 1:1000, после чего мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и визуализировали с помощью хемолуминесценции с помощью геле-документирующей системы Fusion Solo (Vilber Lourmat, Франция).

В качестве положительного контроля апоптоза использовали ингибитор ДНК-топоизомеразы¹ II типа доксорубин. Для исследования применяли следующие концентрации материалов (ОУНТ-1, ОУНТ-2, хризотил-асбест): 2,5 мкг/мл, 0,04 мкг/мл и 0,0006 мкг/мл.

Метод темнопольной микроскопии использовали для визуализации ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста в культурах клеток BEAS-2B. Микроскопию клеточных культур проводили на микроскопе Olympus BX51 (Япония), оснащённом темнопольным конденсором CytoViva® для визуализации в режиме тёмного поля с масляной иммерсией [28,29]. Темнопольные изображения были получены с использованием полуапохроматического объектива Olympus ($\times 100$, переменная числовая апертура 0,6–1,3), CCD-видеокамеры Dage xL и программного обеспечения Exponent 7 (Dage-MTI). Применение темнопольной микроскопии позволяет визуализировать наноразмерные частицы в клетках [28,29].

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2007. Для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли t-критерий Стьюдента. При $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение. По данным динамического светорассеяния в суспензиях ОУНТ и хризотил-асбеста, подготовленных на основе культуральных сред DMEM и BEGM, преобладали агломераты размером до 1000 нм.

Результаты MTS-теста через 48 ч после воздействия ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста показали высокую выживаемость клеток RAW 264.7 и BEAS-2B и отсутствие прямого цитотоксического действия (рис. 1,2). Выживаемость клеток под действием всех исследуемых материалов была не ниже 87% по сравнению с контролем и статистически не отличалась от контроля.

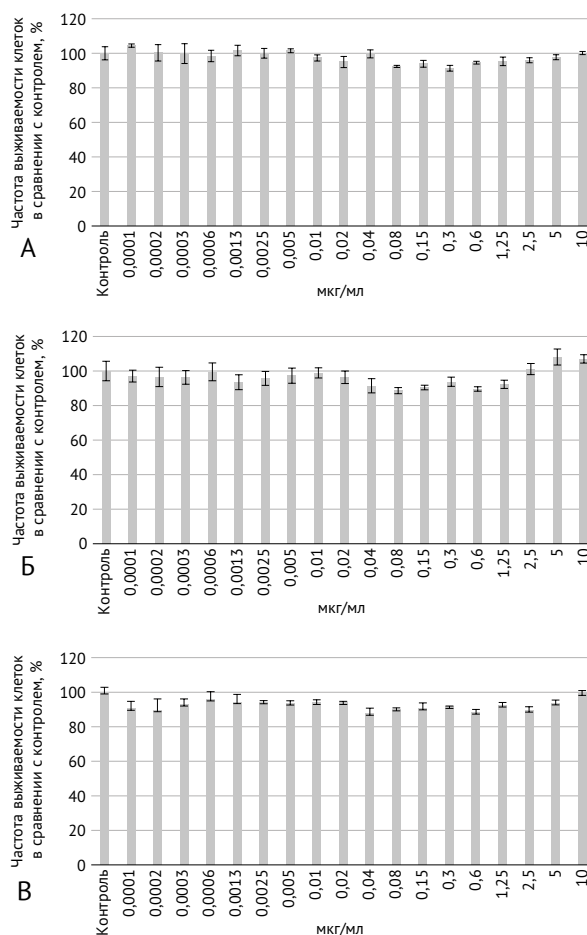


Рис. 1. Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток линии RAW 264.7; среднее значение \pm стандартное отклонение выживаемости клеток в MTS-тесте после 48-часовой экспозиции исследуемых материалов: А — ОУНТ-1; Б — ОУНТ-2; В — хризотил-асбест; $p > 0,05$ для всех сравнений с 0 мкг/мл в контроле

Анализ результатов экспрессии маркеров апоптоза методом вестерн-блота в клетках RAW 234.7 и BEAS-2B показал отсутствие апоптогенного эффекта, оцениваемого в сравнении с действием положительного контроля (доксорубин), для ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста (рис. 3,4). При этом на клетках бронхиального эпителия BEAS-2B было выявлено повышение экспрессии расщеплённой формы ПАРП в сравнении с отрицательным контролем — клеточной средой (см. рис. 4), более выраженное для ОУНТ-2.

Изучение экспонированных культур BEAS-2B под действием концентрации 2,5 мкг/мл (наибольшая концентрация, на которой оценивали способность исследуемых материалов к индукции апоптоза) методом улучшенной темнопольной микроскопии выявило адсорбцию и накопление всех изученных материалов

¹ ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

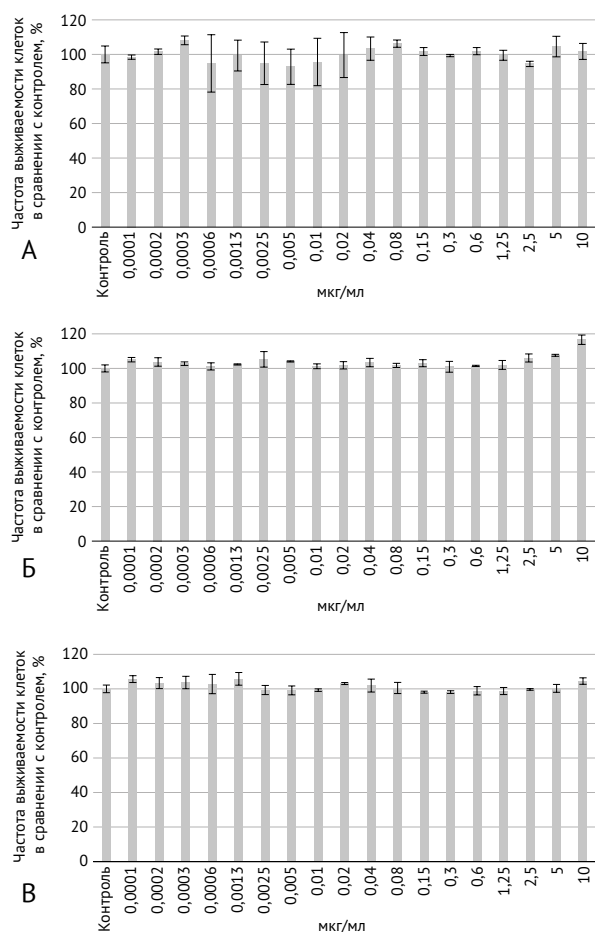


Рис. 2. Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток линии BEAS-2В; среднее значение ± стандартное отклонение выживаемости клеток в MTS-тесте после 48-часовой экспозиции исследуемых материалов: А — ОУНТ-1; Б — ОУНТ-2; В — хризотил-асбест; $p > 0,05$ для всех сравнений с 0 мкг/мл в контроле

(ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста) на поверхности и внутри клеток (указаны стрелками на рис. 5).

При проведении анализа сравнительной токсичности ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста выявлено, что все исследуемые материалы не проявили прямой цитотоксичности в MTS-тесте в выбранном диапазоне концентраций (0,0001–10 мкг/мл) в отношении обеих клеточных культур. В других исследованиях с использованием клеточных культур BEAS-2В и RAW 264.7 цитотоксичность в диапазоне концентраций 0,8–6,6 мкг/мл была показана для ОУНТ [9,30], диспергированных в потенциально токсичной среде Pluronic F12® [31]. В нашем исследовании материалы диспергировали в биосовместимой культуральной среде [26]. Клетки бронхиального эпителия оказались более чувствительными к действию обоих типов

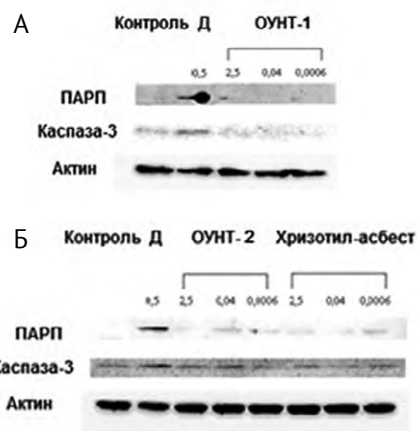


Рис. 3. Картина репрезентативного вестерн-блота на клетках линии RAW 264.7 (инкубация 48 ч): А — ОУНТ-1; Б — ОУНТ-2 и хризотил-асбест; материалы использовались в концентрациях 0,0006, 0,04 и 2,5 мкг/мл; маркёр апоптоза — расщеплённые формы каспазы-3 и поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП); актин отражает уровень белка в образцах; доксорубин (Д) — 0,5 мкг/мл



Рис. 4. Картина репрезентативного вестерн-блота на клетках линии BEAS-2В (инкубация 48 ч): А — ОУНТ-1; Б — ОУНТ-2; В — хризотил-асбест; материалы использовались в концентрациях 0,0006, 0,04 и 2,5 мкг/мл; маркёр апоптоза — расщепленная форма поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП); актин — отражает уровень белка в образцах; доксорубин (Д) — 0,5 мкг/мл

ОУНТ, чем макрофаги RAW264.7: на культуре BEAS-2В для ОУНТ-1 и ОУНТ-2 выявлено повышение экспрессии сигнального белка ПАРП.

Экспрессия генов сигнальных белков апоптоза (каспаса 3/7, бах) выявлена в другом исследовании для концентраций ОУНТ 2,5 и 25 мкг/мл [32]. Действие хризотил-асбеста не оказало про-

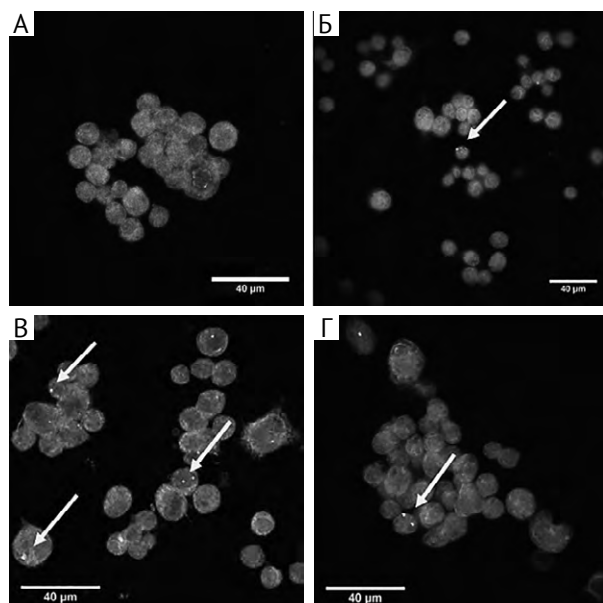


Рис. 5. Визуализация проникновения ОУНТ-1, ОУНТ-2 и хризотил-асбеста в цитоплазму клеток посредством темнопольной микроскопии. Клетки BEAS-2B под действием исследуемых материалов в концентрации 2,5 мкг/мл (48 ч экспозиции): А — контроль (клеточная среда BEGM), Б — ОУНТ-1; В — ОУНТ-2; Г — хризотил-асбест

апоптического эффекта на исследуемые клетки в выбранном диапазоне концентраций, что может быть обусловлено меньшей удельной площадью поверхности хризотил-асбеста в сравнении с ОУНТ [33].

Следует отметить, что оба типа ОУНТ, несмотря на различия в морфологических характеристиках, демонстрировали примерно одинаковые эффекты. Этот результат при его дальнейшей верификации может иметь важное практическое применение, так как позволяет предположить наличие общих механизмов, определяющих особенности взаимодействия ОУНТ с биологическими системами, и, соответственно, единых подходов к определению критериев безопасности ОУНТ как однотипного класса наноматериалов.

Заключение. Результаты исследования показали, что воздействие изучавшихся материалов не вызвало прямого цитотоксического действия в MTS-тесте и не оказало апоптического эффекта по результатам вестерн-блота в отношении макрофагов RAW264.7 и клеток бронхиального эпителия BEAS-2B. В проявивших большую чувствительность клетках бронхиального эпителия выявлено небольшое повышение экспрессии сигнального апоптического белка ПАРП, более выраженное для более коротких ОУНТ-2.

Следует отметить, что в настоящем исследовании применяли дозы, определённые на

основе консервативного сценария, который предусматривал моделирование по концентрации 1 мкг/м³, во много раз превышающей реальное содержание ОУНТ в воздухе рабочей зоны. Дальнейшее изучение клеточных реакций в более широком диапазоне доз и при увеличенном времени экспозиции может способствовать выявлению механизмов действия разных типов ОУНТ для определения биомаркёров, сигнализирующих о возможном запуске определённого пути повреждения и гибели клеток.

ВЫВОД

Оба типа одностенных углеродных нанотрубок, несмотря на различия в морфологических характеристиках, демонстрировали схожие эффекты в экспериментах *in vitro*. Этот результат при его дальнейшей верификации может иметь важное практическое применение при обосновании подходов к определению критериев безопасности одностенных углеродных нанотрубок как однотипного класса наноматериалов.

Участие авторов. Г.А.Т. — обзор литературы по теме исследования, культивирование клеток, проведение тестов (MTS, вестерн-блот) на клетках, статистическая обработка данных, построение рисунков, обобщение полученных результатов; П.Д.Д. — культивирование клеток, проведение тестов (MTS, вестерн-блот) на клетках, обобщение полученных результатов; А.М.Д. — разработка методов подготовки суспензий материалов для внесения в клетки; Г.Ф.Г. — проведение тестов (MTS, вестерн-блот) на клетках, статистическая обработка данных, построение рисунков; Н.Н.Х. — проведение темнопольной микроскопии клеток, обобщение полученных результатов; Р.Ф.Ф. — разработка методов визуализации наноматериалов в клетках (темнопольная микроскопия); С.В.Б. — организация исследования на клетках, обобщение полученных результатов; Л.М.Ф. — руководство исследованием, разработка плана и дизайна исследования, обзор литературы по теме исследования, формирование цели, задач исследования, обобщение полученных результатов.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-315-90046. Разработка методов визуализации материалов в клетках (Фахруллин Р.Ф.) выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых учёных (№МД-2153.2020.3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carbon nanotubes. <https://www.transparency market research.com/pressrelease/carbon-nano-tubes-market.htm> (дата обращения: 12.06.2021).
2. Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: *In vitro* and *in vivo* detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2009; 2: 85–120. DOI: 10.1007/s12274-009-9009-8.
3. Bianco A., Kostarelos K., Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005; (6): 674–679. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.10.005.
4. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; (22): 6531–6535. DOI: 10.1093/nar/18.22.6531.
5. Kisin E.R., Murray A.R., Keane M.J., Shi X.C., Schwegler-Berry D., Gorelik O., Arepalli S., Castranova V., Wallace W.E., Kagan V.E., Shvedova A.A. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2007; (24): 2071–2079. DOI: 10.1080/15287390701601251.
6. Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology.* 2014; 8 (3): 233–278. DOI: 10.3109/17435390.2013.773464.
7. Li Y., Doak S.H., Yan J., Chen D.H., Zhou M., Mittelstaedt R.A., Chen Y., Li C., Chen T. Factors affecting the *in vitro* micronucleus assay for evaluation of nanomaterials. *Mutagenesis.* 2017; 32 (1): 151–159. DOI: 10.1093/mutage/gew040.
8. Herzog E., Casey A., Lyng F.M., Chambers G., Byrne H.J., Davoren M. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials — the clonogenic assay. *Toxicol. Letters.* 2007; 174 (1–3): 49–60. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.08.009.
9. Park E.J., Zahari N.E., Lee E.W., Song J., Lee J.H., Cho M.H., Kim J.H. SWCNTs induced autophagic cell death in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. in vitro.* 2014; 28 (3): 442–450. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.12.012.
10. Халиуллин Т.О., Кисин Е.Р., Мюррэй Р.Э., Залаялов Р.Р., Шведова А.А., Фатхутдинова Л.М. Токсические эффекты углеродных нанотрубок в культурах клеток макрофагов и бронхиального эпителия. *Вестн. Томского гос. ун-та. Биология.* 2014; (1): 199–210. [Khaliullin T.O., Kisin E.R., Murray R.A., Zalyalov R.R., Shvedova A.A., Fatkhutdinova L.M. Toxic effects of carbon nanotubes in macrophage and bronchial epithelium cell cultures. *Tomsk State University journal of biology.* 2014; (1): 199–210. (In Russ.)]
11. Davoren M., Herzog E., Casey A., Cottineau B., Chambers G., Byrne H.J., Lyng F.M. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. in vitro.* 2007; 21 (3): 438–448. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.10.007.
12. Pulskamp K., Diabaté S., Krug H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Letters.* 2007; 168 (1): 58–74. DOI: 10.1016/j.toxlet.2006.11.001.
13. Wörlé-Knirsch J.M., Pulskamp K., Krug H.F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters.* 2006; 6 (6): 1261–1268. DOI: 10.1021/nl060177c.
14. Fujita K., Fukuda M., Endoh S., Kato H., Maru J., Nakamura A., Uchino K., Shinohara N., Obara S., Nagano R., Horie M., Kinugasa S., Hashimoto H., Kishimoto A. Physical properties of single — wall carbon nanotubes in cell culture and their dispersal due to alveolar epithelial cell response. *Toxicol. Mechanisms and Methods.* 2013; 23 (8): 598–609. DOI: 10.3109/15376516.2013.811568.
15. Clift M.J., Endes C., Vanhecke D., Wick P., Gehr P., Schins R.P., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. A comparative study of different *in vitro* lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes. *Toxicol. Sci.* 2014; 137 (1): 55–64. DOI: 10.1093/toxsci/kft216.
16. Witasz E., Shvedova A.A., Kagan V.E., Fadeel B. Single-walled carbon nanotubes impair human macrophage engulfment of apoptotic cell corpses. *Inhalation Toxicol.* 2009; 21 (Suppl. 1): 131–136. DOI: 10.1080/08958370902942574.
17. Khaliullin T.O., Kisin E.R., Murray A.R., Yanamala N., Shurin M.R., Gutkin D.W., Fatkhutdinova L.M., Kagan V.E., Shvedova A.A. Mediation of the single-walled carbon nanotubes induced pulmonary fibrogenic response by osteopontin and TGF- β 1. *Experim. Lung Res.* 2017; 43 (8): 311–326. DOI: 10.1080/01902148.2017.1377783.
18. Murr L.E., Garza K.M., Soto K.F., Carrasco A., Powell T.G., Ramirez D.A., Guerrero P.A., Lopez D.A., Venzor J.3rd. Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Intern. J. Environ. Res. Public Health.* 2005; 2 (1): 31–42. DOI: 10.3390/ijerph2005010031.
19. Migliore L., Saracino D., Bonelli A., Colognato R., R.D'Errico M., Magrini A., Bergamaschi A., Bergamaschi E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW264.7 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 2010; 51: 294–303. DOI: 10.1002/em.20545.
20. Dong P.X., Wan B., Guo L.H. *In vitro* toxicity of acid-functionalized single-walled carbon nanotubes: effects on murine macrophages and gene expression profiling. *Nanotoxicology.* 2012; 6 (3): 288–303. DOI: 10.3109/17435390.2011.573101.
21. Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G., Alexander A. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol. Sci.* 2006; 92 (1): 5–22. DOI: 10.1093/toxsci/kfj130.
22. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). <https://www.cdc.gov/niosh/index.htm> (access date: 12.06.2021).
23. Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD v 3.04). <https://www.ara.com/products/multiple-path-particle-dosimetry-model-mppd-v-304> (access date: 14.06.2021).
24. Li Y., Boraschi D. Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies. *Nanomedicine (Lond.)*. 2016; 11 (3): 269. DOI: 10.221/nnm.15.19619.
25. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) (утв. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 31 октября 2018 г.). <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/11/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xiv-izdaniya> (дата обращения: 14.06.2021). [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition (approved by order of the Ministry of Health of the Russian Federation on October 31, 2018). <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/11/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xiv-izdaniya> (access date: 14.06.2021)]
26. Timerbulatova G., Dimiev A.M., Khamidullin T., Boichuk S.V., Dunaev P., Fakhruullin R., Khaertdinov N.N., Porfiryeva N.N., Khaliullin T., Fatkhutdinova L. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in biocompatible envi-

ronments. *Nanotechnologies in Russia*. 2020; 15: 437–444. DOI: 10.1134/S1995078020040163.

27. Методические указания МУ 1.2.2635-10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов» (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 24 мая 2010 г.) <https://docs.cntd.ru/document/1200083582> (дата обращения: 14.06.2021). [Methodical instructions MU 1.2.2635-10 “Medical and biological assessment of the safety of nanomaterials” (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation G.G. Onishchenko on May 24, 2010). <https://docs.cntd.ru/document/1200083582> (access date: 14.06.2021)]

28. Чередниченко Ю.В., Евтюгин В.Г., Нигаматзянова Л.Р., Ахатова Ф.С., Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф. Синтез наночастиц серебра при помощи ультразвука и галлуазита для создания нанокompозита с антибактериальными свойствами. *Рос. нанотехнол.* 2019; 14 (9–10): 64–70. [Cherednichenko Y.V., Nigmatzyanova L.R., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhrullin R.F., Evtugyn V.G. Silver nanoparticle synthesis using ultrasound and halloysite to create a nanocomposite with antibacterial properties. *Nanotechnologies in Russia*. 2019; 14 (9–10): 456–461.] DOI: 10.1134/S1995078019050021.

29. Fakhrullin R., Nigmatzyanova L., Fakhrullina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting

nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci. Total Environment*. 2021; 772: 145–178. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145478.

30. Park E.J., Zahari N.E., Kang M.S., Lee S.J., Lee K., Lee B.S., Yoon C., Cho M.H., Kim Y., Kim J.H. Toxic response of HIPCO single-walled carbon nanotubes in mice and RAW264.7 macrophage cells. *Toxicol. Lett.* 2014; 229 (1): 167–177. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.015.

31. Kharissova O.V., Kharisov B.I., de Casas Ortiz E.G. Dispersion of carbon nanotubes in water and non-aqueous solvents. *RSC Adv.* 2013; 3: 24 812–24 852. DOI: 10.1039/c3ra43852.

32. Ghosh M., Murugadoss S., Janssen L., Cokic S., Mathysen C., Van Landuyt K., Janssens W., Carpentier S., Godderis L., Hoet P. Distinct autophagy-apoptosis related pathways activated by Multi-walled (NM 400) and Single-walled carbon nanotubes (NIST-SRM2483) in human bronchial epithelial (16HBE14o-) cells. *J. Hazard Mater.* 2020; 387: 121691. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121691.

33. Shvedova A.A., Yanamala N., Kisin E.R., Tkach A.V., Murray A.R., Hubbs A., Chirila M.M., Keohavong P., Sycheva L.P., Kagan V.E., Castranova V. Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year postexposure comparisons. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2014; 306 (2): 170–182. DOI: 10.1152/ajplung.00167.2013.