

УДК 546.71: 546.74 : 615.916

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ (НА ПРИМЕРЕ NiO И Mn₃O₄)

И.А. Минигалиева¹, Т.В. Бушueva¹, Э. Фрёлх²,
К. Майндл³, К. Элингер², В.Г. Панов³,
А.Н. Вараксин³, В.Я. Шур⁴, Е.В. Шишкина⁴,
В.Б. Гурвич¹, Б.А. Кацнельсон

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация

²Центр медицинских исследований Медицинского университета Граца, г. Грац, Австрия

³Институт промышленной экологии УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург, Российская Федерация

⁴Институт естественных наук и математики ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Сравнительная и комбинированная оценка повреждающего действия наночастиц NiO и Mn₃O₄ получена на культурах различных человеческих стабильных клеточных линий. Найдено, что добавление эмбриональной бычьей сыворотки крови (FBS) ко всем использованным культуральным средам делает эти металлооксидные наночастицы (MeO-НЧ), в особенности, Mn₃O₄-НЧ экспоненциально растворимыми, в то время как без FBS их растворимость крайне низка. Вместе с тем, присутствие FBS существенно замедляет седиментацию, связанную с агрегацией этих MeO-НЧ. Показана зависимость повреждения клеток от концентрации MeO-НЧ при более высокой цитотоксичности Mn₃O₄-НЧ по сравнению с NiO-НЧ. Таким образом, сравнительная оценка неспецифической токсичности, полученная ранее в экспериментах «in vivo», воспроизведена «in vitro». Однако по отношению к ранее обнаруженному марганец-специфичному повреждению головного мозга при субхронической интоксикации теми же наночастицами, нынешний эксперимент на нейронах «in vitro» показал лишь некоторое усиливающее влияние Mn₃O₄-НЧ в комбинации с NiO-НЧ, роль которых преобладала.

Ключевые слова: оксид марганца, оксид никеля, наночастицы, токсичность «in vitro»

Введение. В то время как подавляющее большинство опубликованных экспериментальных работ в области нанотоксикологии металлов и металлоидов было проведено «in vitro» на культурах стабильных клеточных линий,

Екатеринбургская межинституциональная нанотоксикологическая группа является одним из первых и всё ещё немногочисленных научных коллективов, с самого начала сосредоточивших свои усилия на изучении общих закономерностей

Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna), кандидат биологических наук, зав. лабораторией промышленной токсикологии ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, ilzira-minigalieva@yandex.ru

Бушueva Татьяна Викторовна (Bushueva Tatiana Victorovna), кандидат медицинских наук, заведующая Научно-производственным отделом Лабораторно-диагностических технологий ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, bushueva@umrc.ru

Фрёлх Элеонора (Fröhlich Esther Eleonore), доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела «Клеточные технологии» в Медицинском Университете г. Грац, Австрия, eleonore.froehlich@medunigraz.at

Майндл Клавдия (Meindl Claudia), медицинский техник отдела «Клеточные технологии» в Медицинском Университете г. Грац, Австрия, kristin.oehlinger@klinikum-graz.at

Элингер Кристина (Öhlinger Kristin), медицинский техник отдела «Клеточные технологии» в Медицинском Университете г. Грац, Австрия, eleonore.froehlich@medunigraz.at

Панов Владимир Григорьевич (Panov Vladimir Grigorievich), кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург, vpanov@esko.uran.ru

Вараксин Анатолий Николаевич (Varaksin Anatoly Nikolayevich), доктор физико-математических наук, профессор лаборатории математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург, varaksin@esko.uran.ru

Шур Владимир Яковлевич (Shur Vladimir Yakovlevich), доктор физико-математических наук, профессор, директор, Уральский центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии», Институт естественных наук и математики, ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург, vladimir.shur@urfu.ru

Шишкина Екатерина Владимировна (Shishkina Yekaterina Vladimirovna), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Уральский центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии», Институт естественных наук и математики ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург, ekatrina.shishkina@labfer.usu.ru

Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich), доктор медицинских наук, директор ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, gurvich@umrc.ru

Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich), доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург, bkatznelson@etel.ru

ностей токсического действия металлических и металлооксидных частиц (MeO-НЧ) на органо-системном уровне «in vivo» [1]. В литературе мы находим только единичные работы, в которых токсичность каких-либо конкретных НЧ на основе обоих подходов, т.е. и «in vitro», и «in vivo» исследовалась одной и той же лабораторией [2, 3].

Единственное известное нам исследование комбинированного цитотоксического действия практически не растворимых частиц, однако, не нанометрового, а микрометрового размера было проведено в нашем коллективе [4]. Микрочастицы диоксида марганца и хромата бария) одним и тем же экспериментатором были исследованы как «in vivo» в интратрахеальном тесте с большим числом цитологических характеристик жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ), так и «in vitro» на первичной культуре крысиных перитонеальных макрофагов по потере жизнеспособности в тесте на не-включение красителя «трипановый синий». Цитотоксическое действие изученных микрочастиц по этому показателю было субаддитивным, а из всех цитологических показателей БАЛЖ преимущественно субаддитивным оно было по проценту явно дегенерированных альвеолярных макрофагов.

Других данных о комбинированном действии каких-либо частиц на какие-либо клетки «in vitro» в литературе или через поисковые системы мы не находим. Первое, насколько нам известно, исследование комбинированной токсичности именно наночастиц было проведено нами в экспериментах «in vivo» с NiO-НЧ и Mn₃O₄-НЧ [5, 6]. Естественным было и первое изучение комбинированной цитотоксичности «in vitro» провести на тех же наночастицах, с тем чтобы впервые оценить принципиальную сопоставимость или несопоставимость обсуждаемых экспериментальных подходов.

В литературе можно найти немало исследований, проведенных на различных стабильных клеточных линиях при воздействии на них наночастиц оксида никеля (например, [3], [7-9] или оксидов марганца (например, [10-14]) и направленных, главным образом на изучение молекулярных механизмов цитотоксичности этих НЧ. Однако ни сравнительная количественная оценка их цитотоксичности, ни эффекты их комбинированного действия в этих работах не рассматривались.

Материалы и методы исследования. Свежие суспензии NiO-НЧ и Mn₃O₄-НЧ были приготовлены с помощью лазерной абляции сверхчистых металлических пластин никеля или марганца под слоем деионизированной воды. Физико-химические и геометрические характеристики полу-

ченных MeO-НЧ были теми же, что при проведении субхронических экспериментов «in vivo» [6]. Средний диаметр наночастиц ($\pm\sigma$) равнялся 16,7 \pm 8,2 для NiO и 18,4 \pm 5,4 для Mn₃O₄.

В экспериментах «in vitro» были использованы следующие стабильные линии человеческих клеток: MRC-5 - фибробласты; ТНР-1 - моноциты, а в отдельной серии эксперимента - макрофаги, полученные из них под влиянием преинкубации с форбол мирилатом ацетатом (по процедуре, описанной у [15]); SH-SY5Y - нейробластомные клетки как с добавлением, так и без добавления ретинола, который стимулирует их дифференциацию в нейрональную клетку [16]. Фибробласты MRC-5 культивировались в среде Minimal Essential Medium (MEM), моноциты и макрофаги ТНР-1 - в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, нейробластомные и нейрональные клетки SH-SY5Y - в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) с добавлением 2mM L-глутамин, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (fetal bovine serum - FBS), и 1% пенициллина/стрептомицина.

Суспензии наночастиц (после ультразвуковой обработки в течение 5-7 секунд, которая была необходима для редиспергирования склонных к агрегации Mn₃O₄-НЧ, но осуществлялась и для NiO-НЧ), вносились в различных объемах изолированно или совместно при различных дозовых соотношениях в культуру, посеянную на 96-луночных планках. Клетки культивировались при 37 \pm 1°C и 5% CO₂. Введение наночастиц во все культуры, кроме не дифференцированной ТНР-1, осуществлялось через 24 часа после посева (то есть уже после образования монослоя), а в не образующую монослоя культуру моноцитов ТНР-1 - сразу же после её посева. Все варианты экспозиции испытывались в 4 повторностях.

Цитотоксический эффект как изолированно, так и комбинированного действия изученных MeO-НЧ количественно оценивался с двух тестов. Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), основан на том, что чем большее количество АТФ в культуре теряет метаболическую активность, тем слабее люминесцентный сигнал, генерируемый этой культурой в присутствии особого реагента. Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), основан на том, что живые клетки способны восстанавливать производные тетразолия до формазана, которое растворяется в среде инкубации, где его концентрация, измеренная по поглощению света при длине волны 490 нм, пропорциональна числу жизнеспособных клеток в культуре.

В отдельной серии экспериментов на клетках линии SH-SY5Y исследовалось также (с помощью иммунохимической техники вестерн-блот-

тинга) влияние наночастиц на содержание тирозингидроксилазы – фермента, контролирующего биосинтез катехоламинов (норадреналина и адреналина), играющих важную роль нейромедиаторов в межнейрональной передаче возбуждения в ЦНС.

Эксперименты на клетках были проведены на базе Центра медицинских исследований Медицинского университета Граца (Австрия) при непосредственном участии первых 5 авторов статьи. Наночастицы для этих экспериментов были получены в Уральском Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» (УрФУ, Екатеринбург); там же проводились эксперименты для изучения растворения и седиментации наночастиц в культуральных средах. Анализ всех экспериментальных результатов и его обсуждение осуществлялись всем авторским коллективом.

Результаты и обсуждение.

Поведение наночастиц в среде инкубации. Авторами многочисленных нанотоксикологических исследований «in vitro» крайне редко уделяется должное внимание тому, что происходит с самими MeO-НЧ за время инкубации в той или иной культуральной среде. Между тем, понимание этого является важнейшим условием правильной токсикологической интерпретации показателей повреждения инкубируемых вместе с ними клеток. В первую очередь, необходимо оценить, не происходят ли такие изменения наночастиц, которые едва ли имеют место «in vivo», но могут существенно исказить цитотоксический эффект «in vitro» (прежде всего, существенная внеклеточная агрегация, препятствующая проникновению первичных наночастиц внутрь не фагоцитирующих клеток). С другой стороны, важно знать, происходит ли в среде инкубации то постепенное растворение MeO-НЧ, не растворимых в водной суспензии, которому придаётся существенная роль в токсикокинетике и токсикодинамике интоксикаций, вызываемых ими «in vivo», и как этот процесс зависит от химической природы наночастиц и от состава культуральной среды.

Судя по опыту, накопленному Екатеринбургской группой, все изученные ею Me-НЧ и особенно MeO-НЧ, будучи практически не растворимыми в де-ионизированной воде, а иногда и в физиологическом растворе, обладают заметной и при том неодинаковой растворимостью при добавлении к ней FBS или супернатанта БАЛЖ. Кинетика такого растворения обычно может быть адекватно описана экспоненциальной функцией (например, [17]), что вероятнее всего, объясняется первоначальным относительно быстрым растворением мельчайших наночастиц, приводящим к постепенному снижению удель-

ной поверхности остающейся нано-суспензии. Соответствующие различия растворимости «in vivo», характеризующие MeO-НЧ, разные по размеру или по химическому составу, естественно отражаются различиями их токсикокинетики, что, в частности, показано при сопоставлении эффектов действия NiO-НЧ и Mn₃O₄-НЧ на органосистемном уровне [6], [18]. Всё это придаёт особое значение вопросу о том, воспроизводятся ли указанные закономерности в экспериментальных моделях цитотоксичности тех же MeO-НЧ «in vitro».

С этой целью, свежеприготовленные суспензии MeO-НЧ после недельного хранения (воспроизводящего вынужденный интервал между изготовлением таких же суспензий в Екатеринбурге и началом работы с ними на клетках в Граце) смешивались в равном объёме с образцами всех вышеперечисленных культуральных сред. Концентрация суспензии измерялась периодически на протяжении 12 часов по интегральному светопоглощению, причём перед каждым измерением суспензия повторно подвергалась ультра-озвучиванию, с тем чтобы свести к минимуму эффект агрегации и связанного с нею осаждения наночастиц).

Было найдено, что во всех средах с добавлением FBS оба вида изучаемых MeO-НЧ постепенно растворяются с кинетикой, аппроксимируемой экспоненциальной функцией $A(t) = A_1 \cdot \exp(-t/\tau) + A_\infty$, где $A(t)$ - показатель светопоглощения на определённый момент времени t в часах, причём параметры этого уравнения (постоянная времени τ и предел A_∞) мало зависят от типа среды, но довольно существенно – от вида наночастиц (табл. 1). При этом важно отметить, что растворение Mn₃O₄, как и в предыдущих наших исследованиях на модельных средах и «in vivo», происходило быстрее, чем растворение NiO.

Вместе с тем, как видно из той же таблицы 1, без добавления FBS к среде растворение обоих видов MeO-НЧ значительно менее выражено и в большинстве случаев ничтожно мало. Можно предположить, что ионы металлов, выходящие с поверхности твёрдого тела (в данном случае, наноразмерного) в жидкую среду, секвестрируются в результате связывания сывороточными белками, в результате чего снижается концентрация свободных ионов в растворе и тем самым – вероятность их реабсорбции той же поверхностью. Поэтому в присутствии FBS баланс между этими двумя противоположно направленными процессами сдвигается в сторону первого.

Таким образом, в отношении сравнительной растворимости двух изученных MeO-НЧ и её кинетики, условия воздействия на клетку «in vitro» в принципе соответствуют условиям «in vivo»,

Снижение концентрации наночастиц в течение 12 часов в результате растворения в культуральных средах

Среда	NiO-НЧ			Mn ₃ O ₄ -НЧ		
	A [∞]	τ, час	(A1-A12)/A1, %	A [∞]	τ, час	(A1-A12)/A1, %
RPMI	1,00	>12	2,4	1,00	>12	3,4
RPMI +FBS	0,80	0,4	20,5	0,66	1,24	33,8
DMEM	1,00	>12	3,9	1,00	>12	-2,9
DMEM + FBS	0,81	0,22	20,2	0,72	1,31	27
MEM	1,00	>12	2,9	0,88	0,35	12,5
MEM + FBS	0,80	0,4	21,8	0,7	1,8	31,6

но только если культуральная среда содержит FBS. Можно думать, что рассмотренное влияние белка ещё более выражено «in vivo», поскольку если добавление 10% FBS создаёт концентрацию белка в среде всего около 5 мг/мл, то в большинстве жидкостей тела она намного выше: например, в перитонеальном трансудате 30 мг/мл, а в плазме крови 600-800 мг/мл [19]. Правда, по нашим собственным данным, внеклеточная фракция БАЛЖ содержит значительно меньше белка, чем культуральные среды с внесением FBS, однако, в случае БАЛЖ ту же роль может играть образование стабильных комплексов металла с фосфолипидами [20].

Вместе с тем, добавление FBS к тем же средам явно стабилизирует нано-суспензию, судя по кинетике снижения её концентрации, измерившейся тем же способом, но без повторного редиспергированная ультразвуком – то есть за счёт осаждения концентрации в результате образования крупных НЧ-агрегатов. Так, например, если в среде RPMI без добавления FBS NiO-НЧ осаждаются за 24 часа полностью, то в той же среде с FBS только на 11-16%. Этот факт, вероятнее всего, связан с хорошо известным образованием так называемой «короны» в результате сорбции белка на поверхности наночастиц, которая препятствует их агрегации, а тем самым - их седиментации¹.

Таким образом, можно считать, что в нано-токсикологических экспериментах с любыми кле-

точными культурами добавление FBS к соответствующей среде является необходимым условием адекватности экспериментальной модели.

Однофакторные зависимости доза-ответ.

Во всех наших экспериментах на клеточных культурах для уравнений, аппроксимирующих зависимости доза – эффект (или ответ) с помощью линейной ($Y = b_0 + b_1X$), лог-линейной ($Y = \exp(b_0 + b_1X)$) и гиперболической ($Y = (b_0 + b_1X) / (b_2 + b_3X)$) функций, были найдены статистически значимые коэффициенты b_i . Поэтому мы выбирали как наиболее адекватную математическую модель этой зависимости ту функцию, для которой сумма квадратов отклонений модельных значений X от найденных в эксперименте показателей цитотоксичности при разных дозах НЧ была минимальной. Примеры найденных зависимостей (рис. 3 и 4) показывают, что они не зависели от конкретного теста на цитотоксичность. В частности, совпадающий характер функции доза-эффект для конкретных MeO-НЧ в двух тестах, существенно разных по механизму образования регистрируемых физических показателей, не удивителен, если учесть взаимосвязанность молекулярно-биологических механизмов, обуславливающих соответствующие эффекты. Действительно, био-восстановление тетразолия до формазана контролируется в значительной степени митохондриальной сукцинат-дегидрогеназой², а между тем, именно в митохондриях происходит то окислительное фосфорилирова-

¹ Выраженное стабилизирующее действие присуще и жидкой фракции БАЛЖ, добавление которой довольно давно было рекомендовано в качестве «улучшенного метода диспергирования наночастиц для исследования их токсичности in vitro и in vivo» [23].

² Это является общепринятой предпосылкой всех тестов, основанных на восстановлении тетразолия до формазана (например, в широко распространённом МП тесте на жизнеспособность клеток или в регулярно используемом нами показателе СДГ-активности лимфоцитов крови при различных интоксикациях). Интересно, что при описании методики эксперимента с наночастицами оксида марганца и культурой клеток РС-12 авторы [10] утверждают, что они использовали тест ММТ, именно как показатель митохондриальной функции, хотя на самом деле не-митохондриальная сукцинат-дегидрогеназа тоже участвует в указанном восстановлении [24].

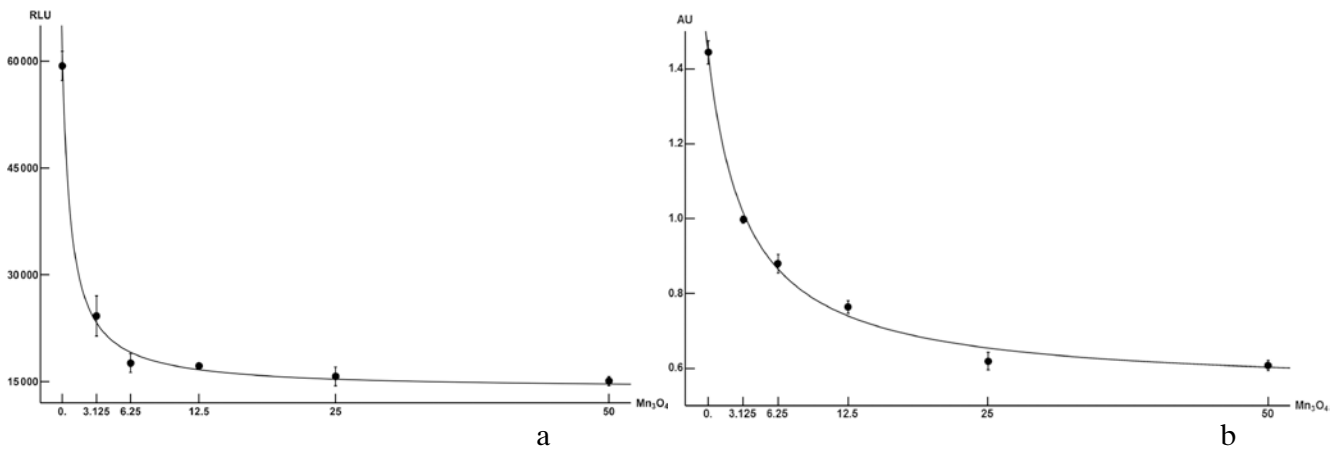


Рис. 1. Зависимость доза-эффект и фактические средние значения эффекта (со статистической ошибкой) после инкубации фибробластов MRC-5 с Mn_3O_4 -НЧ (а) для интенсивности люминесцентного сигнала (ось X - концентрация наночастиц, мкг/мл; ось Y - Relative Light Units (RLU) - относительные световые единицы); (б) для концентрации формазана в среде (ось X - концентрация наночастиц, мкг/мл; ось Y - Absorbance Units (AU), единицы светопоглощения).

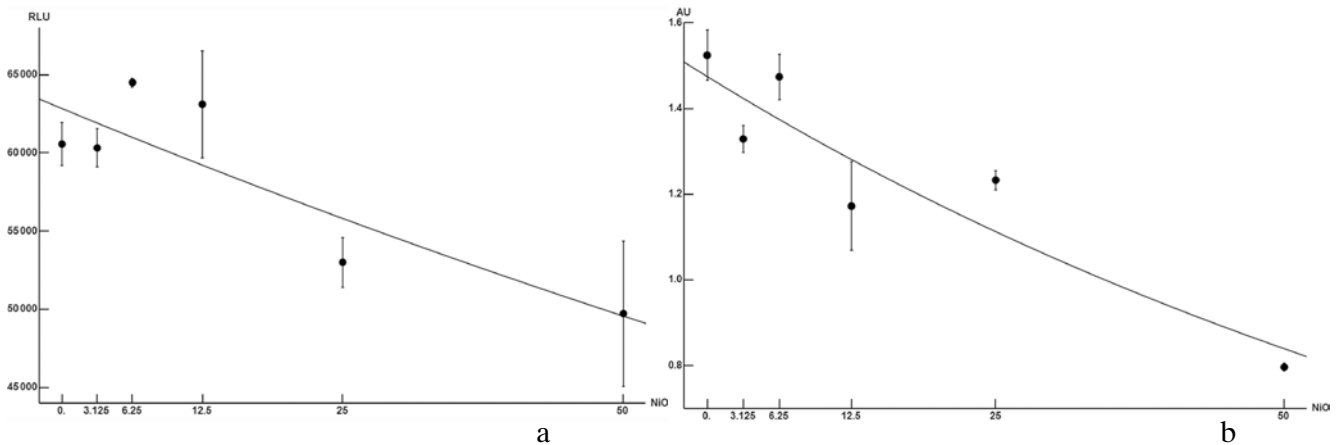


Рис. 2. Зависимость доза-эффект и фактические средние значения эффекта (со статистической ошибкой) после инкубации фибробластов MRC-5 с NiO -НЧ (а) для интенсивности люминесцентного сигнала (ось X - концентрация наночастиц, мкг/мл; ось Y - Relative Light Units (RLU) - относительные световые единицы); (б) для концентрации формазана в среде (ось X - концентрация наночастиц, мкг/мл; ось Y - Absorbance Units (AU), единицы светопоглощения).

ние, при угнетении которого снижается образование АТФ и, следовательно, люминесцентный сигнал в тесте Titer Glo Luminescent Cell Viability. То, что разные по составу металлооксидные НЧ, действуя раздельно или в комбинации вызывают «in vivo» неодинаковые по тяжести, но качественно однотипные ультраструктурные повреждения митохондрий показано на других MeO -НЧ, однако токсичность на митохондриальном уровне («митотоксичность»), очевидно, присуща многим ядам, в том числе, тяжёлым металлам [25].

Однако показанной этими же примерами (рис. 1 и 2) предпочтительности той или иной функциональной зависимости для описания результатов эксперимента с NiO -НЧ или с Mn_3O_4 -НЧ во всех вариантах эксперимента в целом выявлено не было (можно лишь сказать, что гиперболическая и лог-линейная модели были более адекватными, чем линейная).

Необходимо подчеркнуть, что обнаружение достоверной зависимости эффекта от дозы имеет несомненное токсикологическое значение, являясь важнейшим подтверждением причинно-следственной связи между тем или иным отклонением состояния биологической системы и каким-то внешним воздействием на ней. С этой точки зрения, экспериментальная модель цитотоксичности наночастиц «in vitro» получила ещё одно подтверждение токсикологической адекватности (во всяком случае, для двух испытанных видов MeO -НЧ). Однако, хотя и можно предположить, что конкретная форма математической модели этой зависимости иногда отражает какие-то биологические механизмы токсичности, обнаружить детерминированность такой модели свойствами конкретного вида MeO -НЧ на нашем материале пока не удалось.

При сопоставлении рисунков 1 и 2 легко заметить также, что эффекты действия NiO-НЧ начинают быть явными при значительно больших дозах, чем аналогичные эффекты действия Mn₃O₄-НЧ. Между тем, по большому числу интегральных показателей сравнительной субхронической токсичности «in vivo» мы так же оценили Mn₃O₄-НЧ как преимущественно более токсичный, чем NiO-НЧ [6]. Однако, судя по цитологическим и биохимическим показателям БАЛЖ после однократного интратрахеального введения соотношение между этими двумя MeO-НЧ было обратным [5] – вероятно, потому, что менее БАЛЖ-растворимые NiO-НЧ сохраняются в глубоких дыхательных путях в большем количестве. Таким образом, несмотря на всё сказанное выше об адекватности условий НЧ-экспозиции клеточной модели, информативность сравнительной оценки токсичности «in vitro» для прогнозирования сравнительной оценки токсичности тех же MeO-НЧ «in vivo» оказывается существенно ограниченной. Ещё менее верным, как будет показано ниже, мог бы оказаться такой прогноз в случае комбинированного воздействия и, что делает его особенно ненадёжным, - по металло-специфической токсичности.

Комбинированная цитотоксичность наночастиц NiO и Mn₃O₄ «in vitro».

Как и во всех рассмотренных нами за последние годы экспериментальных моделях бинарного комбинированного действия различных MeO-НЧ (в том числе, NiO-НЧ и Mn₃O₄-НЧ) на крыс, в опытах на человеческих стабильных

клеточных линиях разной природы мы нашли, что комбинированная цитотоксичность (КЦТ) «in vitro» не может быть однозначно характеризована как аддитивная, субаддитивная или супераддитивная. Эта неоднозначность классификации КЦТ не связана с особенностями используемых тестов, поскольку мы её обнаруживаем даже при оценке эффекта одним и тем же методом (например, Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay). Математическое моделирование КЦТ с помощью той же самой Surface Response Methodology, которая использовалась для анализа комбинированного действия MeO-НЧ «in vivo» (Katsnelson, Minigalieva et al. 2015), показало, что форма и наклон изоболограмм зависят от типа клетки, от дифференциации нейробластомных клеток в нейрональные или моноциты – в макрофаги) и от концентрации MeO-NP в среде инкубации. Изоболограммы, представленные на рисунке 3, иллюстрируют сказанное на примере клеток линии THP-1 в форме моноцитов или макрофагов.

При сравнении представленных этим рисунком изоболограмм (b) и (c) нельзя попутно не отметить, что цитотоксичность как Mn₃O₄-НЧ, так и NiO-НЧ для монослойной культуры макрофагов выше, чем для культуры «плавающих» моноцитов. Можно предположить, что это связано не с большей чувствительностью первых к повреждающему действию наночастиц, а с большей «жадностью» их фагоцитарного захвата. Известно (например [26]), что прилипание макрофага к пластиковой поверхности является одним из факторов, спо-

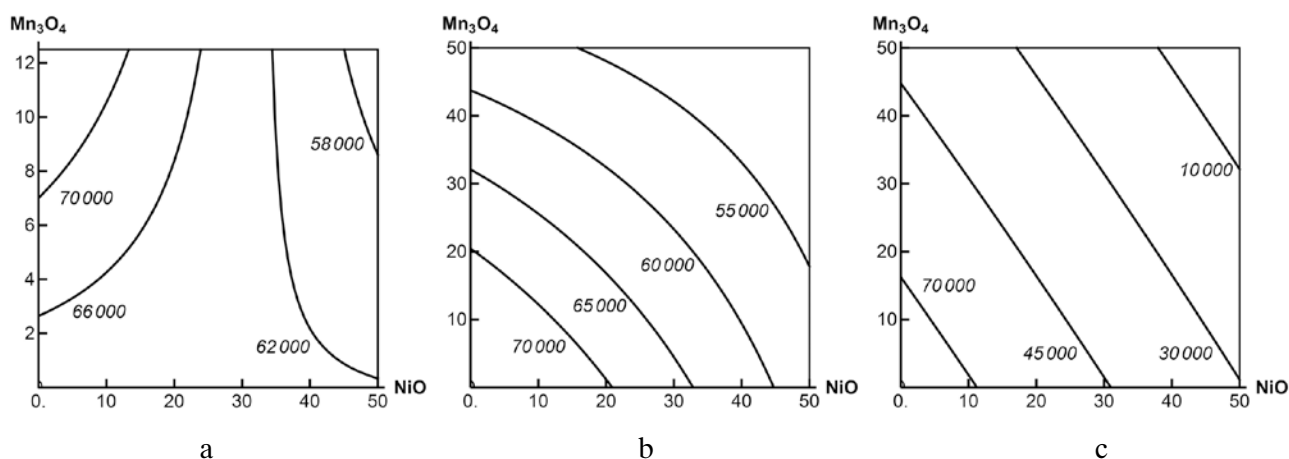


Рис. 3. Примеры изоболограмм, характеризующих КЦТ наночастиц NiO-НЧ и Mn₃O₄-НЧ по эффекту снижения люминесцентного сигнала в трёх экспериментах на клетках линии THP-1: (а) при низких дозах Mn₃O₄ действие на моноциты противонаправленное по отношению к действию низких доз NiO, но однонаправлено супераддитивное по отношению к действию высоких доз NiO; (b) на таких же моноцитах при высоких дозах обоих видов MeO-НЧ видна субаддитивность однонаправленного действия; (с) при тех же дозах, но на макрофагах видна аддитивность однонаправленного действия. На осях концентрация NiO and Mn₃O₄ в мкг/мл, на кривых – та величина эффекта в RLU, на уровне которой данная изоболограмма получена.

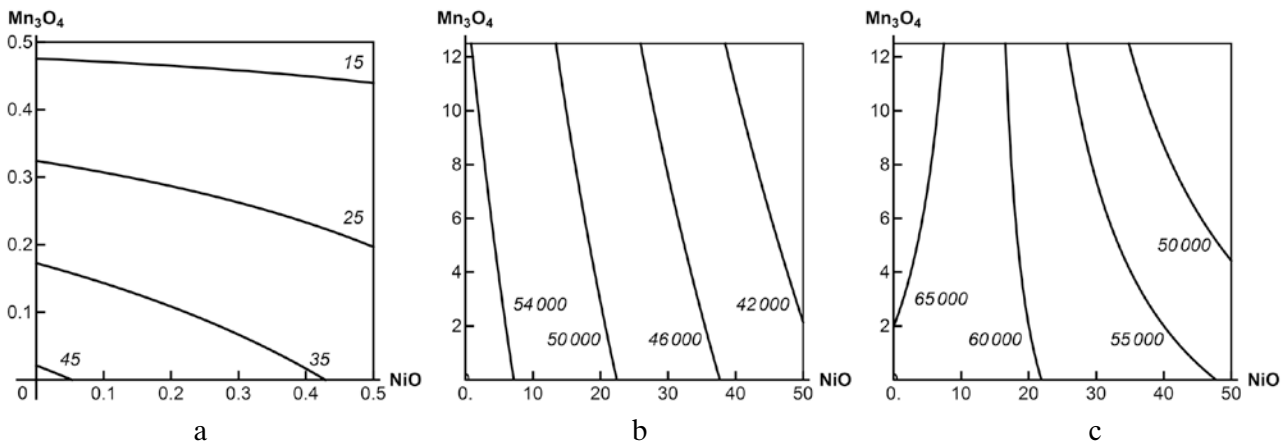


Рис. 4. Примеры изоболограмм, иллюстрирующие несовпадение оценок типа комбинированной токсичности в экспериментах «in vivo» и «in vitro»: (а) в субхроническом эксперименте на крысах по эффекту снижения не повреждённых нейронов в гиппокампе CA1 (небольшая тенденция к аддитивности при преобладании однофакторного действия наночастиц Mn_3O_4); (б) в эксперименте на клетках линии SH-SY5Y без ретинола по эффекту снижения люминесцентного сигнала (незначительная аддитивность при преобладании однофакторного действия наночастиц NiO); (с) в таком же эксперименте в присутствии ретинола (тенденция супераддитивности на высоких уровнях эффекта, но вновь при преобладании однофакторного действия наночастиц NiO). На осях доза в мг на крысу или концентрация NiO и Mn_3O_4 в среде, мкг/мл, на кривых – та величина эффекта, на уровне которой данная изоболола получена.

собствующих его переходу в особое состояние активации, важным проявлением которого является повышенная фагоцитарная активность клетки. Кроме того, она может быть дополнительно повышена под влиянием продуктов разрушения погибших макрофагов [27].

Если общая закономерность комбинированной токсичности, заключающаяся в неоднозначности её типа в зависимости от многих факторов, неоднократно подтверждавшаяся в наших исследованиях «in vivo», была безусловно выявлена и в первом же исследовании КЦТ на клеточных культурах, то воспроизводимости конкретного типа комбинированного действия мы не получили. Особенно важно то, что это несовпадение оценок, получаемых «in vitro» и «in vivo», касается и того нейротоксического эффекта, который для данной комбинации является одним из наиболее важных и по отношению к которому мог бы быть выбран «основной» или «определяющий» тип комбинированной токсичности для принятия решений в сфере оценки риска [28]. Не было найдено по этому специфическому эффекту и соответствия сравнительных оценок токсичности NiO-НЧ и Mn_3O_4 -НЧ.

Действительно, повреждение нейронов в хвостатом ядре и гиппокампе мозга крыс при субхронической комбинированной интоксикации теми же двумя MeO-НЧ было обусловлено в основном характерным для всех соединений марганца нейротоксическим действием наночастиц его оксида. При этом NiO-НЧ несколько усиливали это действие по типу аддитивной или субаддитивной комбинированной токсич-

ности, пример чего воспроизведен рисунком 4(а). Вместе с тем, как видно из рисунков 4(б) и 4(с), повреждение той же комбинацией «in vitro» как нейробластомных клеток линии SH-SY5Y, так и производных от неё в присутствии ретинола нейрональных клеток определялось преимущественно действием NiO-НЧ, а сопутствующее действие Mn_3O_4 -НЧ его лишь несущественно усиливало.

При этом в экспериментах на нейрональных клетках – производных линии SH-SY5Y (т.е. в присутствии ретинола) было найдено, что такой парадоксальный тип комбинированной токсичности NiO и Mn_3O_4 характерен не только для неспецифического эффекта гибели клетки, но и для такого важного специфического именно для нейронов функционального эффекта как уменьшение тирозин-гидроксилазной активности³. Как видно из рисунка 5, и в этом случае явно преобладает однофакторное действие оксида никеля, а оксид марганца лишь незначительно потенцирует его.

Таким образом, если в исследовании на целостном организме мы получили экспериментальный коррелят марганцевого паркинсонизма, то трактовать с точки зрения системно-организменной токсикологии результаты эксперимента на нейрональной клеточной линии

³ Этот эффект выбран в качестве маркера потому, что тирозин-гидроксилаза является ферментом, активность которого лимитирует синтез дофамина, и его дефициту приписывается главная роль в развитии болезни Паркинсона [29], а для её изучения в экспериментах «in vitro» предпочтение отдаётся именно дифференцированным клеткам линии SH-SY5Y [30].

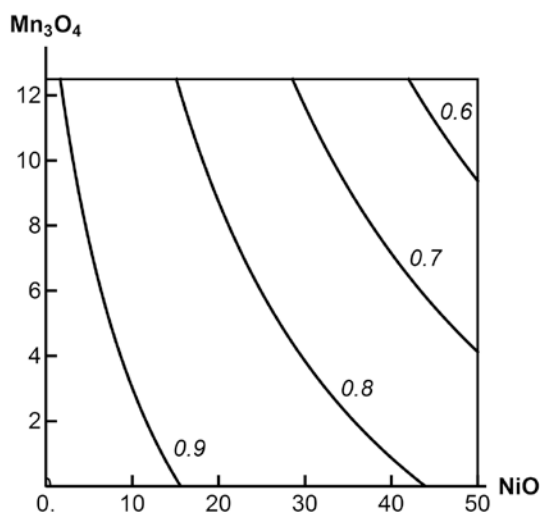


Рис. 5. Изоболограмма, характеризующая комбинированное действие наночастиц Mn_3O_4 -НЧ и NiO-НЧ на активность тирозин-гидроксилазы в культуре клеток линии SH-SY5Y (с ретинолом), выраженную как отношение к активности в контрольной культуре. Слабая тенденция к супераддитивности при преобладании однофакторного действия наночастиц NiO. На осях концентрация NiO and Mn_3O_4 в мкг/мл, на кривых – та величина эффекта на уровне которой данная изоболограмма получена.

затруднительно. Подобного рода трудности ещё значительнее, когда речь идёт об экстраполяции на целостный организм результатов комбинированного воздействия, полученных на клетках, имеющих ещё меньшее отношение к основному органу-мишени (например, на моноцитах/макрофагах или на фибробластах).

Выводы. 1. Для гигиенической оценки сравнительной неспецифической токсичности металлооксидных наночастиц предварительный скрининг на культурах, стабильных клеточных линий при добавлении FBS к среде инкубации

создаёт в целом адекватную экспериментальную модель и может иметь ограниченное прогностическое значение.

2. Для гигиенически и профпатологически значимой оценки комбинированной токсичности металлооксидных наночастиц эксперименты на целостном организме лабораторных животных, вероятнее всего, являются более информативным методом, чем эксперименты на клеточных культурах, даже имеющих биологическое родство с основным органом-мишенью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES:

1. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Loginova N.V., Minigaliev I.A. et al. Some inferences from in vivo experiments with metal and metal oxide nanoparticles: the pulmonary phagocytosis response, subchronic systemic toxicity and genotoxicity, regulatory proposals, searching for bioprotectors (a self-overview). *International J. Nanomedicine*. 2015; 10: 3013-3029
2. Chen Q., Xue Y., Sun J. Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomed*. 2013; 8, 129-1140.
3. Horie M., Fukui H., Nishio K., Endoh S., Kato H., Fujita K. et al. Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro. *J Occup Health*. 2011; 53: 64-74.
4. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Varaksin A.N., Panov V.G., Balesin S.L. The pulmonary phagocytosis response to separate and combined impacts of manganese (IV) and chromium (VI) containing particulates. *Toxicology*. 2016; 370: 78-85
5. Кацнельсон Б. А., Минигалиева И. А., Привалова Л. И., Сутункова М. П., Гурвич В. Б., Шур В. Я. и др. Реакция глубоких дыхательных путей крысы на однократное интратрахеальное введение наночастиц оксидов никеля и марганца или их комбинации и её ослабление биопротекторной премедикацией. *Токс. Вестник*. 2014; 6: 8-14/ Katsnelson B.A., Minigaliev I.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Shur V.Y. et al. Lower airways response to a single or combined intratracheal instillation of manganese and nickel nanoparticles and its attenuation with a bio-protective pre-treatment. *Toxicological Review*, 2014; 6 (129): 8-14 (in Russian).
6. Katsnelson B.A., Minigaliev I.A., Panov V.G., Privalova L.I., Varaksin A.N., Gurvich V.B. et al. Some patterns of metallic nanoparticles' combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles. *Food Chem. Toxicol*. 2015a; 86: 351-364
7. Pietruska J. R., Liu X., Smith A., McNeil K., Weston P., Zhitkovich A., Hurt R., Kane A. B. Bioavailability, intracellular mobilization of nickel, and HIF-1 alpha activation in human lung epithelial cells exposed to metallic nickel and nickel oxide nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2011; 124: 138-148.
8. Ahamed M., Ali D., Alhadlaq H. A., Akhtar M. J. Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). *Chemosphere*. 2013; 93: 2514-2522.
9. Duan W. X., He M. D., Mao L., Qian F. H., Li Y. M., Pi H. F. et al. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; 286(2):80-91.
10. Hussain S.M., Javorina A.K., Schrand A.M., Duhart E.M., Ali S.F., Schlager J.J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol. Sciences*. 2006; 92: 456-463
11. Choi J.Y., Lee S.H., Na H.B., An K., Hyeon T., Seo T.S. In vitro cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2010; 33: 21-30
12. Ivask A., Titma T., Visnapuu M., Vija H., Kakinen A., Sihtmaa M. et al. Toxicity of 11 metal oxide nanoparticles to three mammalian cell types in vitro. *Curr Top Med Chem*. 2015; 15:1914-1929.
13. Khan S., Ansari A.A., Khan A.A., Abdulla M., Al-Obeed O., Ahmad R. In vitro evaluation of anticancer and biological activities of synthesized manganese oxide nanoparticles. *Med. Chem. Commun*. 2016; 7: 1647-1653
14. Alarif S., Ali D., Alkhatani S. Oxidative stress-Induced DNA damage by manganese dioxide nanoparticles in human neuronal cells. *Hindawi BioMed Research International*, 20Vol. 2017, Article ID 5478790, 10 pages
15. Chanput W., Peters V., Wichers H. THP-1 and U937 Cells. Chapter 14 of "The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models" (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds., Springer International Publishing), 2015; 147-159
16. Kovalevich J., Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*. 2013; 1078: 9-21
17. Sutunkova M.P., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Gurvich V.B., Konyshva L.K., Shur V.Ya. 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: 19-28
18. Minigaliev I.A., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich V.B., Shur V.Y. et al. Attenuation of combined nickel (II) oxide and manganese (II,III) oxide nanoparticles' adverse effects with a complex of bioprotectors. *Int. J. of Mol. Sci*. 2015; 16 (9): 22555-22583
19. Barber B.J., Schultz T.J., Randlett D.L. Comparative analysis of protein content in rat mesenteric tissue, peritoneal fluid, and plasma. *Am J Physiol*. 1990; 258: 714-718.
20. Stewart Hendrickson H., Fullington J. G. Stabilities of metal complexes of phospholipids: Ca(II), Mg(II), and Ni(II) complexes of phosphatidylserine and

triphosphoinositide. *Biochemistry*. 1965; 4: 1599-1605

21. del Pino P., Pelaz B., Zhang Q., Maffre P., Nienhaus G.U., Parak W. J. Protein corona formation around nanoparticles – from the past to the future. *Mater. Horiz.* 2014; 1: 301-313

22. Zhdanov V.P., Cho N.J. Kinetics of the formation of a protein corona around nanoparticles. *Math Biosci.* 2016; 282: 82-90

23. Sager T.M., Porter D. W., Robinson V.A., Lindsley W.G., Schwegler-Berry D.E. Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro

and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology*. 2007; 1: 118-129

24. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*. 2002; 47:236-242

25. Meyer J.N., Leung M.K.L., Rooney J.P., Sandoel A., Hengartner M.O., Kisbey G.E. at all. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci.* 2013; 134: 1-17

26. Kelley J.L., Rozek M.M., Suenram C.A., Schwartz C.J. Activation of human blood monocytes by adherence to tissue

culture plastic surfaces. *Exp.Mol. Pathol.* 1987; 46(3): 266-78.

27. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Sharapova. N.Y., Kislitsina N.S. On the relationship between activation and breakdown of macrophages in the pathogenesis of silicosis (an overview). *Med.Lavoro*. 1995; 86: 511-521

28. Minigaliev I.A., Katsnelson B.A., Panov V.G., Varaksin A.N., Gurchich V.B., Privalova L.I. at all. Experimental study and mathematical modeling of toxic metals combined action as a scientific foundation for occupational and environmental health risk assessment.

A summary of results obtained by the Ekaterinburg research team. *Toxicology Reports*. 2017b; 4C. 194-201

29. ZhuY., Zhang J., Zeng Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012; 11: 350-358

30. Khwanraj K., Phruksaniyom C., Madlah S., Dharmasaroja P. Differential expression of tyrosine hydroxylase protein and apoptosis-related genes in differentiated and undifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with MPP+. *Neurology Research International*, 2015: article ID 734703

I.A. Minigaliev¹, T.V. Bushueva¹, E. Fröhlich², C. Meindl², K. Öhlinger², V.G. Panov³, A.N. Varaksin³, V.Ya. Shur⁴, E.V. Shishkina⁴, V.B. Gurchich¹, B.A. Katsnelson¹

SOME ASPECTS OF METAL OXIDE NANOPARTICLES TOXICITY ASSESSMENT ON CELL CULTURES AS EXEMPLIFIED BY NiO AND Mn₃O₄

¹Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation

² Center for Medical Research of the Medical University of Graz, Graz, Austria

³Institute of Industrial Ecology, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, 620990, Ekaterinburg, Russian Federation

⁴School of Natural Sciences and Mathematics, the Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russian Federation

Comparative and combined damaging actions of NiO and Mn₃O₄ nanoparticles were estimated on cultures of different established human cell lines. It was found out that the addition of the fetal bovine serum (FBS) to the culture media, used in the investigation, renders NiO-NPs and, to even a greater extent, Mn₃O₄-NPs exponentially soluble while without FBS their dissolution was extremely low. Along with it, sedimentation of those MeO-NPs caused by their aggregation noticeably slowed down in the presence of the same FBS. The dependence of cell damage on the MeO-NPs concentration was found out, at a higher cytotoxicity of Mn₃O₄-NP as compared to NiO-NP. Thus, comparative assessment of NPs non-specific toxicity previously obtained in animal experiments was reproduced in the «in vitro» tests. However, with respect to manganese-specific brain damage «in vivo» discovered previously in sub-chronic intoxication with the same MeO-NPs, the present «in vitro» experiment on neurons only showed a certain enhancing effect of Mn₃O₄-NP on the action of NiO-NP, but the role of NiO-NP in the combination prevailed.

Keywords: manganese oxide, nickel oxide, nanoparticles, in vitro toxicity.

Материал поступил в редакцию 01.08.2017 г.

