

Тимербулатова Гюзель Абдулхалимовна

ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРОМЫШЛЕННО-ПРОИЗВОДИМЫХ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ
НАНОТРУБОК

3.2.1. Гигиена

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Фатхутдинова Лилия Минвагизовна**

Официальные оппоненты:

Соседова Лариса Михайловна - доктор медицинский наук, профессор, заведующий лабораторией биомоделирования и трансляционной медицины с виварием Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований».

Шилов Виктор Васильевич - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологии, экстремальной и водолазной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова».

Защита диссертации состоится «15» декабря 2022 г. в _____ часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.2.061.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 420012, , г. Казань, ул. Бутлерова, д.49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49 б) и на сайте организации (www.kazangmu.ru).

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Тaufеева Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Глобальный рынок углеродных нанотрубок (УНТ) растет с каждым годом (Transparency Market Research, 2022). УНТ, обладающие уникальными физико-химическими свойствами, применяются для производства композитных материалов, солнечных и аккумуляторных батарей, химических сенсоров, дисплеев, антикоррозионных материалов, бионаносенсоров, имплантов, оптических меток и контрастных агентов для детекции и визуализации биомолекул. Одностенные УНТ (ОУНТ) имеют ряд важных технологических преимуществ по сравнению с многостенными УНТ (МУНТ), в первую очередь при создании композитов (Леонов А. А. и соавт. 2019) и в области бионанотехнологий (Liu Z. и соавт. 2009).

Несмотря на технологические преимущества ОУНТ, до недавнего времени на рынке УНТ доминировали МУНТ. Широкое применение ОУНТ в промышленности было невозможно из-за дорогостоящих технологий их массового производства и недостаточно разработанных методов внесения в материалы. В настоящее время российские производители (<https://ocsial.com/>) заявляют о том, что им удалось разработать технологию получения ОУНТ, значительно снижающую их стоимость, что позволяет выйти на промышленные масштабы производства.

С учетом растущих объемов производства, проведение исследований в области обеспечения безопасности при производстве и применении наноматериалов, включая УНТ, является одним из приоритетных направлений, способствующих гармоничному развитию инновационной отрасли наноиндустрии (Онищенко Г.Г. и соавт. 2011; 2015). Наноразмерные объекты характеризуются высокой проникающей способностью, большой площадью и особыми физико-химическими свойствами поверхности и, как следствие, высокой реакционной активностью (Fadeel В. и соавт. 2017). Понимание того, как свойства наноматериалов определяют их взаимодействие с клетками,

тканями и органами, становится первостепенной задачей, которую необходимо решать для обоснования подходов к безопасному использованию (Гмошинский И.В. и соавт. 2017).

Оценка токсических эффектов ОУНТ проводилась в основном с использованием ОУНТ типа HiPco (Francis P. и соавт. 2018). Ограничениями опубликованных исследований являются высокие дозы, подобранные в расчете на получение хорошо фиксируемого биологического ответа и не соответствующие реальным производственным экспозициям; использование лабораторных образцов, а не промышленных ОУНТ; применение токсичных соединений для перевода ОУНТ в гомогенные дисперсии.

В настоящее время накоплен достаточный объем данных по концентрациям УНТ в воздухе рабочих мест различных производств, свидетельствующий о наличии в воздухе рабочей зоны относительно невысоких концентраций (Guseva Canu I. и соавт. 2016; 2020), что диктует необходимость нового этапа токсикологических исследований с применением более низких доз и концентраций, по сравнению с ранними исследованиями.

В настоящее время при оценке токсичности широкое распространение получила концепция «3Rs» (Refinement, Reduction and Replacement), или концепция «меньше животных – меньше болезненных процедур – применение альтернативных методов» (NANoREG, 2016), предполагающая применение методов, альтернативные классическим тестам на экспериментальных животных, в том числе модели с использованием культур клеток (Chetyrkina M. и соавт. 2022; Макарова М. и соавт. 2022). Возникает необходимость выбора методов и моделей *in vitro*, которые могли бы сократить количество животных в исследованиях (Гуськова О.А. и соавт. 2015) и способствовать выявлению молекулярно-клеточных механизмов и особенностей действия веществ при контакте с биологическими объектами (NANoREG, 2016).

Таким образом, внедрение инновационной технологии промышленного производства нового типа российских ОУНТ привело к появлению на рынке нового типа наноматериалов, что обуславливает актуальность проведения

токсикологических исследований с разработкой современных подходов к обоснованию критериев безопасности.

Цель исследования: токсиколого-гигиеническая характеристика нового типа промышленно-производимых ОУНТ на основе изучения реакции легочной ткани в экспериментах *in vitro* и *in vivo* с обоснованием подходов к разработке критериев безопасности ОУНТ.

Задачи:

1. Обосновать диапазон концентраций/доз нового типа промышленно-производимых ОУНТ для проведения токсикологических экспериментов *in vitro* и *in vivo* на основании гигиенической характеристики экспозиции к ОУНТ в условиях производства.

2. Разработать способ получения биосовместимых дисперсий нового типа промышленно-производимых ОУНТ.

3. Оценить цитотоксическое, апоптогенное, профиброгенное, генотоксическое воздействие нового типа промышленно-производимых ОУНТ на клеточные культуры дыхательной системы в экспериментах *in vitro*.

4. Оценить реакцию легочной ткани в ответ на воздействие нового типа промышленно-производимых ОУНТ в экспериментах *in vivo*.

5. Разработать подходы к обоснованию критериев безопасности нового типа промышленно-производимых ОУНТ.

Научная новизна. Впервые представлена токсиколого-гигиеническая характеристика нового типа промышленно-производимых ОУНТ при воздействии на дыхательную систему в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Установлено, что в концентрациях/дозах, соответствующих реальным производственным экспозициям, ОУНТ TUBALL™ не обладают профиброгенным и генотоксическим действием. Минимальная цитотоксическая концентрация ОУНТ (25 мкг/мл, для клеточной культуры бронхиального эпителия BEAS-2B), минимальная действующая концентрация, повышающая уровень экспрессии гена профиброгенного цитокина – остеопонтина (100 мкг/мл, для клеточной культуры бронхиального эпителия BEAS-2B),

минимальная действующая доза, вызывающая реакцию в виде начальных признаков развития соединительной ткани в легких экспериментальных животных (40 мкг на крысу), соответствовали депонированным легочным дозам, рассчитанным для концентраций ОУНТ TUBALL™ в воздухе рабочей зоны, многократно превышающих производственные экспозиции.

Разработан способ диспергирования ОУНТ TUBALL™ с получением стабильных биосовместимых дисперсий для использования в токсикологических экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Разработан способ определения диапазона концентраций/доз для токсикологических экспериментов *in vitro* и *in vivo* на основе компьютерного моделирования массы ОУНТ, осевшей в легких человека или животных, с учетом концентраций и дисперсности ОУНТ в воздухе рабочей зоны в реальных производственных условиях.

Показано, что определение уровня экспрессии гена остеопонтина в культуре клеток бронхиального эпителия человека BEAS-2B может применяться в качестве скринингового теста для прогнозирования профиброгенного потенциала ОУНТ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенные исследования на клетках дыхательных путей человека позволили показать, что ОУНТ могут проникать в клетки, а механизм токсического действия ОУНТ связан с нарушением метаболизма и повреждением мембран клеток. Профиброгенный и цитотоксические эффекты наблюдались лишь при высокодозных воздействиях. ОУНТ с агрегатами меньших размеров проявляли более выраженное цитотоксическое действие, что позволяет предположить необходимость накопления больших количеств ОУНТ в клетке для проявления токсических эффектов на клеточном уровне, зависимость проникновения в клетки от размеров частиц, а также участие метаболических нарушений и мембранных повреждений в активации процессов фиброгенеза.

На основе полученных результатов *in vitro* на клетках различных отделов дыхательной системы человека определена наиболее подходящая

экспериментальная клеточная модель для оценки воздействия ОУНТ - клетки бронхиального эпителия BEAS-2B.

В ходе выполнения диссертационной работы разработано, получено и коммерциализовано ноу-хау (секрет производства) «Способ оценки параметров токсичности ОУНТ в клеточных культурах, в эксперименте *in vivo*, и контроля содержания ОУНТ в воздухе рабочей зоны». Разработан способ получения биосовместимых дисперсий ОУНТ TUBALL™; способ внедрен в работу ЦНИЛ ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Материалы диссертационного исследования использованы при разработке методических рекомендаций «Оценка параметров токсичности ОУНТ «TUBALL» в эксперименте *in vivo*», «Оценка параметров токсичности ОУНТ «TUBALL» в клеточных культурах», «Определение корпоративного норматива содержания ОУНТ «TUBALL» в воздухе рабочей зоны», «Контроль содержания ОУНТ «TUBALL» в воздухе рабочей зоны», которые внедрены в работу Фонда инфраструктурных и образовательных программ РОСНАНО и предприятия-производителя ОУНТ.

Материалы диссертационного исследования внедрены в работу лаборатории токсико-гигиенических исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)».

С использованием материалов диссертационного исследования разработаны рабочая программа, фонд оценочных средств и учебно-методические пособие по дисциплине «Токсикология», внедренные в учебный процесс кафедры гигиены, медицины труда и кафедры профилактической медицины и экологии человека ФПК И ППС ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы базировалась на совокупности методов токсиколого-гигиенической оценки в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, статистических методов исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Диапазон концентраций/доз для токсикологических экспериментов *in*

in vitro и *in vivo* должен включать концентрации/дозы, полученные с учетом массы ОУНТ, депонированных в легких человека или животных. Масса депонированных ОУНТ рассчитывается на основе компьютерного моделирования осаждения взвешенных частиц в различных отделах дыхательной системы с учетом концентраций и дисперсности ОУНТ в воздухе рабочей зоны в производственных условиях.

2. Для получения биосовместимых дисперсий ОУНТ TUBALL™ следует применять ультразвуковую соникацию суспензий ОУНТ на основе дисперсионных агентов, содержащих белково-ростовые комплексы, в режиме 750 Вт, 20 кГц, 40% амплитуды, пульс 5/6, 30 минут.

3. Воздействие ОУНТ TUBALL™ в концентрациях, соответствующих экспозициям при их производстве, не оказывает цитотоксического, апоптогенного, профиброгенного, генотоксического действия на культуры клеток дыхательной системы человека. При концентрациях, многократно превышавших реальные производственные экспозиции, был выявлен цитотоксический и профиброгенный потенциал ОУНТ TUBALL™.

4. Интратрахеальная инстилляционная ОУНТ TUBALL™ в дозе 1 мкг на животного (крыса), соответствующая производственной экспозиции (1 мкг/м³), в 20 раз превышавшей реальную концентрацию ОУНТ в воздухе рабочей зоны, не вызвала изменений легочной ткани животных спустя 90 дней наблюдения и рассматривается как недействующая доза. Начальные признаки формирования соединительной ткани в легких крыс наблюдались через 90 дней после интратрахеальной инстилляционной ОУНТ TUBALL™ только в дозе 40 мкг на животного (крыса).

5. Методические подходы к обоснованию критериев безопасности ОУНТ должны быть основаны на последовательном применении *in vitro* и *in vivo* методов. В качестве скрининговых тестов рекомендуется определение уровней экспрессии гена остеопонтина, цитотоксических эффектов и генотоксичности с применением метода ДНК-комет при внесении биосовместимых дисперсий ОУНТ в культуру клеток бронхиального эпителия человека BEAS-2B.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Исследование проводилось с достаточным количеством наблюдений, использованием современных методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов статистического анализа.

Диссертационная работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований проект №19-315-90046 Аспиранты.

Основные положения диссертации были доложены на V международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы» (NLS-2018), г. Казань, 2018 г.; X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», г. Москва, 2018г.; XV Российском Национальном Конгрессе с международным участием «Профессия и здоровье», г. Самара, 2019 г.; Всероссийской научно-практической конференции «Научное сопровождение деятельности учреждений Роспотребнадзора», г. Екатеринбург, 2019г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием по программам инноваций в области медицины труда «Трудовое долголетие: инновационная кристаллизация проблем ранней диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, респираторных и онкологических заболеваний», г. Новосибирск, 2019 г.; 9th Nano conference, США, 2020г.; XIII Всероссийском научно-практическом виртуальном форуме с международным участием «Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни», Казань, 2021 г.; 12-й Международной научной конференции Международной ассоциации производственной гигиены (ИОНА2021), 2021 г., Даегу, Южная Корея; XVI Российском национальном конгрессе с международным участием «Профессия и здоровье», 2021г., г. Владивосток; XIV Всероссийской научно-

практической конференции с международным участием «Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни», Казань, 2022 г. Диссертационная работа апробирована на заседании научной проблемной комиссии «Организация здравоохранения и медико-профилактическое дело» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России 30.06.2022 г. (протокол №7).

На основе материалов исследования опубликовано 15 научных работ, том числе, 6 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства высшего образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований, из них 4 статьи в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Scopus, WoS). Опубликовано 1 учебно-методическое пособие.

Личный вклад автора. Автором определены цель и задачи, объем, объекты и методы исследования, организованы и проведены эксперименты на клетках и животных, выполнен статистический анализ. Интерпретированы полученные результаты, сформулированы выводы и разработаны практические рекомендации. Автором подготовлены публикации по результатам проведенных исследований.

Объем и структура и диссертации. Диссертационная работа изложена на 151 странице, содержит 9 таблиц и 30 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, состоящего из 197 источников, в том числе 38 отечественных и 159 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по теме исследования.

Во второй главе представлен дизайн исследования, описаны используемые материалы и методы (Таблица 1). В исследовании используются

два типа ОУНТ TUBALL™: очищенные и неочищенные от металлических примесей, непосредственно выпускаемые на производстве.

Таблица 1 - Виды и объем исследований, выполненных на отдельных этапах исследования

№	Вид исследования	Единица измерения	Число измерений
Этап 1. Обоснование диапазона доз/концентраций ОУНТ TUBALL™ для проведения экспериментов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> на основании гигиенической характеристики экспозиции к ОУНТ в условиях производства			
1.1.	Отбор проб воздуха рабочей зоны на рабочих местах и контрольных точках на СЭЦ-фильтры	фильтры	13
1.2.	Проведение ПЭМ СЭЦ-фильтров с отобранными пробами	фильтры	13
1.3.	Отбор проб воздуха рабочей зоны для проведения Рамановской спектроскопии	фильтры	15
1.4.	Исследование проб методом Рамановской спектроскопии	фильтры	12
1.5.	Компьютерное моделирование индивидуальной депонированной дозы ОУНТ в дыхательных путях человека и крысы (программа MPPD, v3.04)	построение модели, расчеты	2
Этап 2. Разработка способа получения биосовместимых дисперсий ОУНТ TUBALL™ для экспериментов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>			
2.1.	Подготовка дисперсий ОУНТ (очищенных и неочищенных) на основе DMEM, BEGM, 1 % бычьего сывороточного альбумина, 1.2-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-фосфохолина в фосфатном буферном растворе (0,01 мг/мл) с использованием различных режимов ультразвуковой соникации	образцы дисперсий ОУНТ	51
2.2.	Проведение ДСР образцов дисперсий ОУНТ (очищенных и неочищенных)	число измерений	33
2.3.	Проведение ПЭМ образцов дисперсий ОУНТ(очищенных и неочищенных)	образцы дисперсий ОУНТ	4
2.4.	Анализ дисперсий на наличие эндотоксина в образцах дисперсий (очищенных и неочищенных)	число исследований	11
Этап 3. Оценка воздействия цитотоксического, апоптогенного, профиброгенного, генотоксического воздействия нового типа ОУНТ TUBALL™ на клеточные культуры дыхательной системы в экспериментах <i>in vitro</i>			
3.1.	Вестерн-блот на клетках RAW264.7 и BEAS-2B, экспонированных к ОУНТ	число исследований	25
3.2.	MTS-тест на клетках RAW264.7, BEAS-2B, A549, экспонированных к ОУНТ	число исследований	240

Продолжение таблицы 1

№	Вид исследования	Единица измерения	Число измерений
Этап 3. Оценка воздействия цитотоксического, апоптогенного, профиброгенного, генотоксического воздействия нового типа ОУНТ TUBALL™ на клеточные культуры дыхательной системы в экспериментах <i>in vitro</i>			
3.3.	ЛДГ-тест на клетках BEAS-2B, A549, экспонированных к ОУНТ	число исследований	60
3.4.	Оценка экспрессии гена остеопонтинина на клетках BEAS-2B, экспонированных к ОУНТ	число исследований	48
3.5.	ДНК-комет на клетках BEAS-2B, экспонированных к ОУНТ	число исследований	12
3.6.	Проведение темнопольной микроскопии на клетках BEAS-2B, экспонированных к ОУНТ	число исследований	3
3.7.	Проведение темнопольной микроскопии на клетках A549, экспонированных к ОУНТ	число исследований	3
3.8.	Проведение ПЭМ клеток BEAS-2B, A549, экспонированных к ОУНТ	число исследований	12
Этап 4. Оценка реакции легочной ткани на воздействие ОУНТ TUBALL™ в экспериментах <i>in vivo</i>			
4.1.	Проведение интратрахеальной инстилляций	крысы	18
4.2.	Морфологические исследования тканей легких	легкие крыс	18

На первом этапе на основе гигиенической оценки содержания ОУНТ в воздухе рабочей зоны с применением Рамановской спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), дополненной компьютерным моделированием осаждения ОУНТ в различных отделах дыхательных путей человека и крысы, определены диапазоны концентраций/доз ОУНТ TUBALL™ для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

На втором этапе разработан способ получения биосовместимых стабильных дисперсий ОУНТ.

На третьем этапе проведена последовательная оценка цитотоксического, апоптогенного, генотоксического, профиброгенного потенциала и визуализация ОУНТ TUBALL™ при воздействии на клеточные культуры дыхательной системы (RAW264.7, BEAS-2B, A549) при 48-часовой экспозиции в диапазоне концентраций 0,0001-10 мкг/мл и 72-часовой экспозиции в диапазоне концентраций 0,0006-200 мкг/мл.

Результаты экспериментов *in vitro* обрабатывались с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2007 и программного обеспечения R (v. 4.0.5). Статистическая значимость различий оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента, для анализа результатов теста ДНК-комет применялся тест Крускалла-Уоллиса.

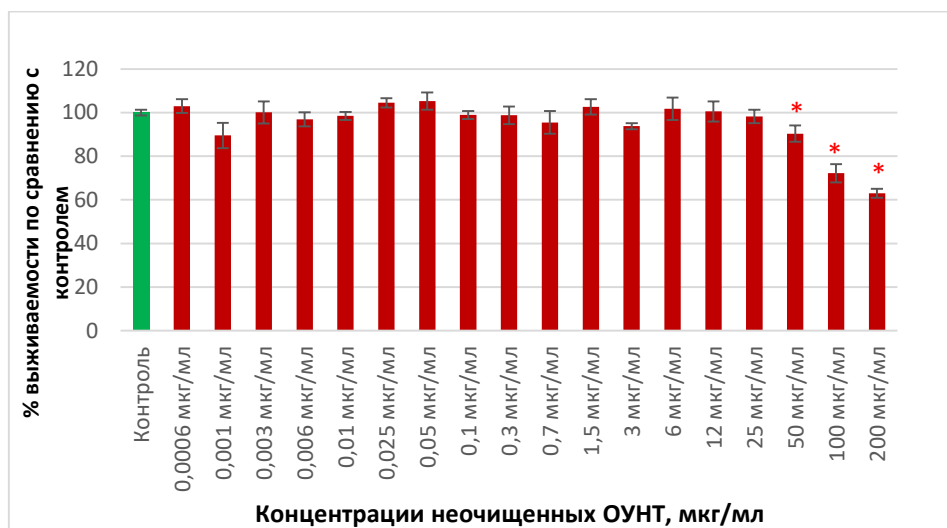
На четвертом этапе проведена оценка реакции легочной ткани спустя 90 дней после однократного интратрахеального введения ОУНТ TUBALL™ крысам в дозе 1 и 40 мкг на крысу. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол №8 от 24.09.2019 г./№7 от 20.09.2022 г.).

В третьей главе описаны полученные результаты. Концентрация ОУНТ TUBALL™ в воздухе рабочей зоны составила 0,05 мкг/м³, что составляет 5% от референтного уровня 1 мкг/м³ при 8-часовой экспозиции, предложенного NIOSH (<https://www.cdc.gov/niosh/index.htm>). С учетом обнаружения низких концентраций ОУНТ в воздухе рабочей зоны, при расчетах депонирования был использован консервативный сценарий, при котором концентрация ОУНТ в воздухе рабочей зоны была принята 1 мкг/м³ при 8-часовой экспозиции за рабочую смену, что с запасом превышало реальные уровни ОУНТ TUBALL™ в воздухе рабочей зоны. Расчетная депонированная доза в легких человека при стаже работы 25 лет составила 3750 мкг, что соответствовало концентрации ОУНТ 0,0011 мкг/мл. Указанная концентрация ОУНТ была определена на основе пересчета общей депонированной массы ОУНТ на массу, приходящуюся на 1 см² альвеолярного эпителия человека, и последующего расчета поверхностной дозы и концентрации с учетом параметров планшетной лунки (площадь поверхности и объем). Итоговый диапазон концентраций для экспериментов *in vitro* составил 0,0001-200 мкг/мл, включая концентрацию, соответствующую депонированию ОУНТ в легких человека при 8-часовой среднесменной концентрации 1 мкг/м³ за 25 лет стажа (0,0011 мкг/мл), с расширением в сторону более низких концентраций, соответствующих экспозициям на производстве, и высоких токсичных концентраций по данным научной литературы. Расчетная масса

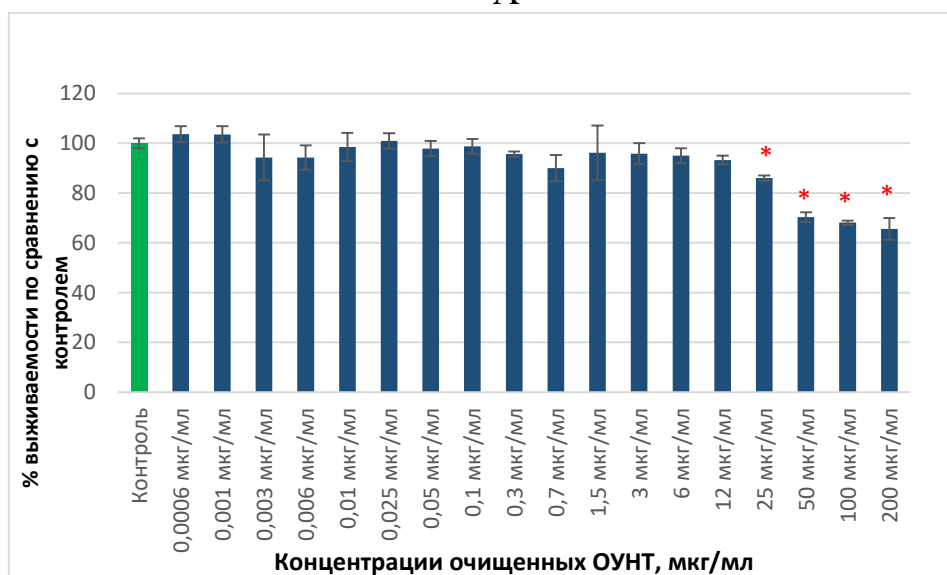
частиц, осаждаемых в легких крысы за 90 дней (длительность субхронического эксперимента) при концентрации ОУНТ в воздухе 1 мкг/м^3 , составила 1,215 мкг ОУНТ. Для экспериментов *in vivo* были использованы дозы 1 мкг на крысу, аппроксимирующая депонирование ОУНТ в легких крысы при 90-дневном ингаляционном поступлении при концентрации ОУНТ в воздухе 1 мкг/м^3 , и 40 мкг на крысу как потенциально токсичная по данным научной литературы.

В ходе серии экспериментов с различными диспергантами и режимами ультразвуковой обработки, разработан способ получения биосовместимых стабильных дисперсий с размером агломератов ОУНТ до 1000 нм, заключающийся в ультразвуковой обработке ОУНТ в клеточных средах Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) и Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM), а также 1% бычьим сывороточном альбумине при помощи ультразвукового соникатора Sonic Vibra Cell Sonicator (Sonics&Materials, США) с параметрами работы 750 Ватт, 20 кГц, 40% амплитуда, пульс 5/6, время 30 минут.

В экспериментах *in vitro* показано, что на концентрациях 0,0001-10 мкг/мл как очищенные, так и неочищенные ОУНТ не проявляли признаков цитотоксичности и индукции проаптогенных эффектов в отношении изученных клеток дыхательной системы. Цитотоксические эффекты ОУНТ (снижение жизнеспособности клеток и повреждение мембраны клеток) были показаны на высоких концентрациях (начиная с 25 мкг/мл) при удлинённом времени экспозиции (72 часа) только для клеток бронхиального эпителия BEAS-2B (Рисунки 1, 2). Очищенные ОУНТ, образующие агломераты меньших размеров, проявляли более выраженное цитотоксическое действие (Рисунок 1Б, Рисунок 2) как в MTS-, так и ЛДГ-тесте.



А



Б

Рисунок 1 – Цитотоксическая активность ОУНТ в отношении клеток BEAS-2B; MTS-тест; $\bar{X} \pm \sigma$; 72-часа экспозиции; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (клеточная среда).

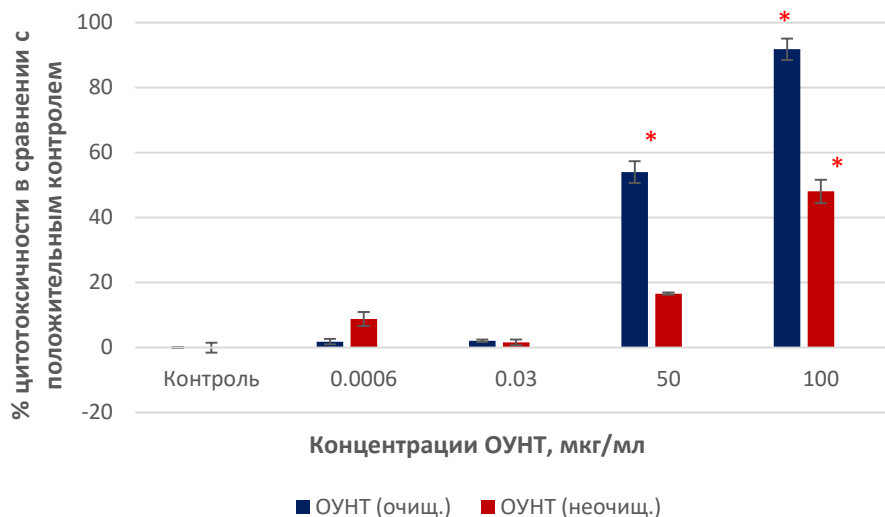


Рисунок 2 – Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток BEAS-2B; ЛДГ-тест; $\bar{X} \pm \sigma$; 72-часа экспозиции: неочищенные ОУНТ; очищенные ОУНТ; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (клеточная среда).

Данные темнопольной микроскопии клеток BEAS-2B, наиболее чувствительных к воздействию ОУНТ, свидетельствовали о присутствии ОУНТ внутри и на поверхности клеток (Рисунок 3).

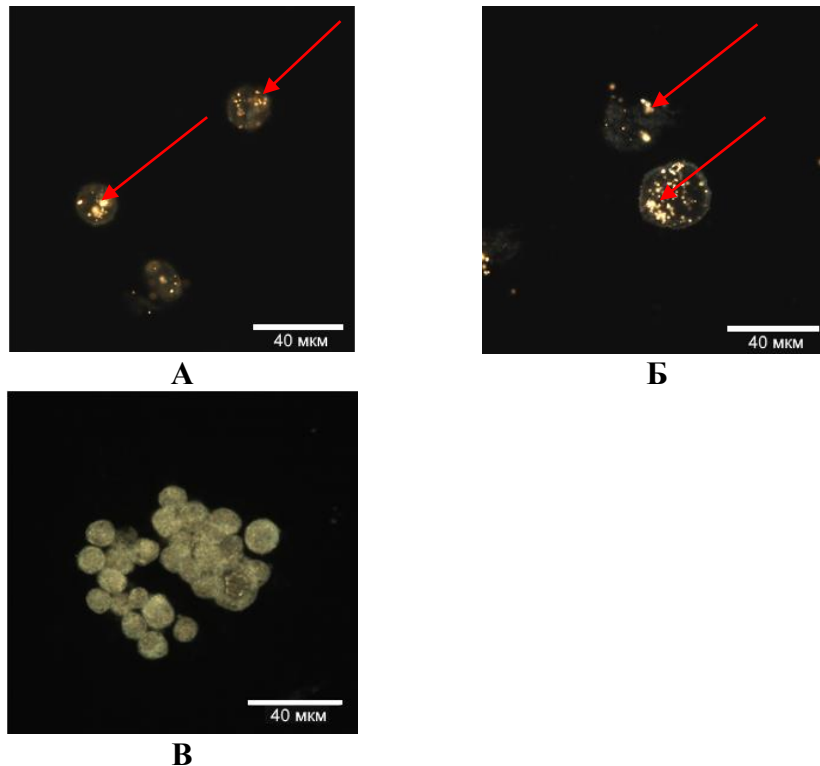


Рисунок 3 – Темнопольная микроскопия клеток BEAS-2B: А – очищенные ОУНТ (100 мкг/мл); Б – неочищенные ОУНТ (100 мкг/мл); В – контроль (клеточная среда).

Изучение внутриклеточной локализации ОУНТ в клетках BEAS-2B с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показало, что агрегаты и единичные ОУНТ находятся в лизосомоподобных структурах или лежат свободно в цитоплазме клеток (Рисунок 4).

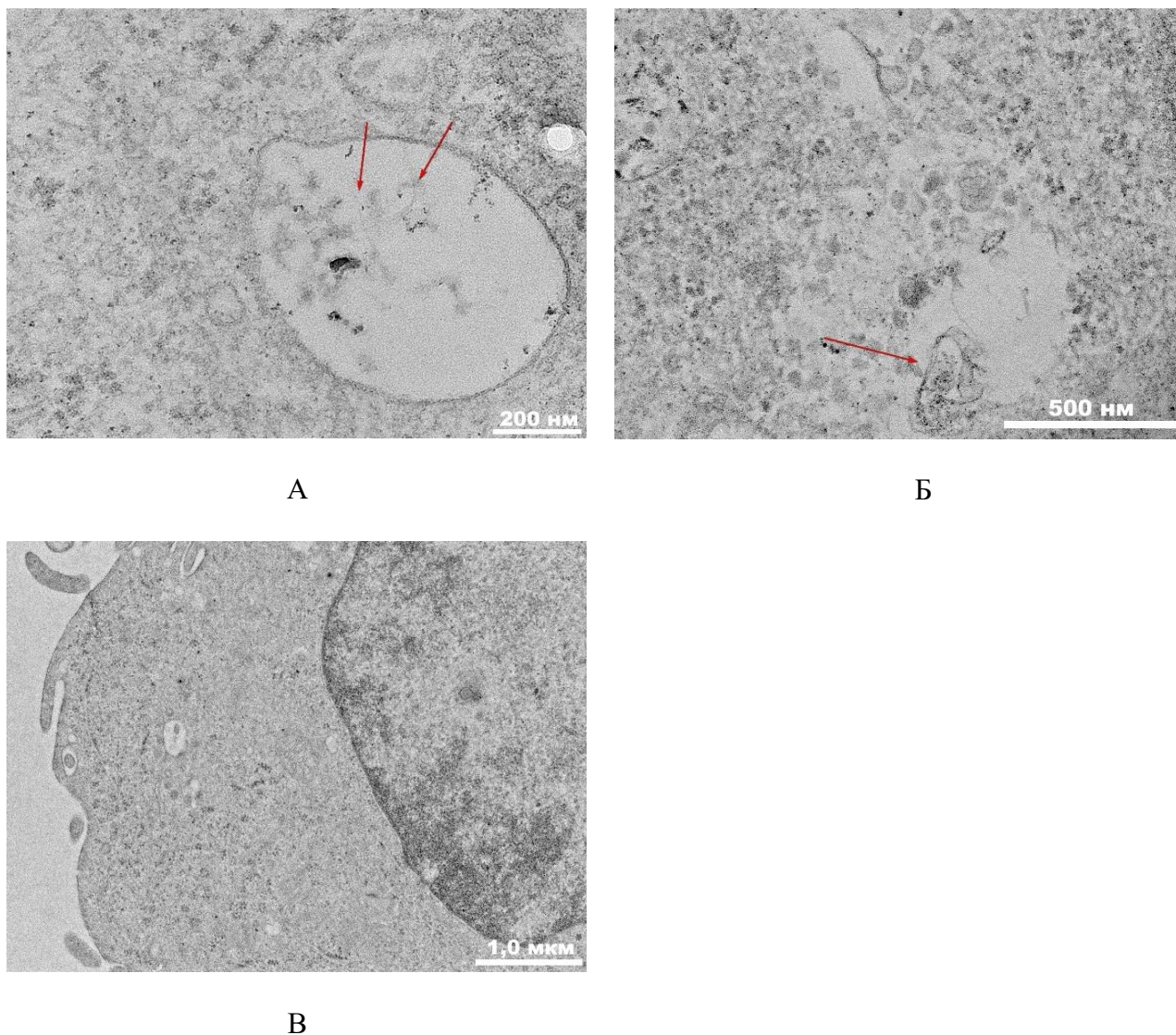


Рисунок 4 – ПЭМ клеток BEAS-2B после 72-часовой экспозиции с ОУНТ в концентрации 100 мкг/мл (стрелка – частицы ОУНТ). А – очищенные ОУНТ (100 мкг/мл); Б – неочищенные ОУНТ (100 мкг/мл); В – контроль (клеточная среда).

Клетки легочного эпителия A549 оказались устойчивыми к воздействию ОУНТ даже на самых высоких концентрациях (до 200 мкг/мл) при 72-часовой экспозиции: цитотоксичность по данным MTS-теста и ЛДГ-теста в

экспонированных клетках статистически значимо не отличалась от контроля. При этом визуализация ОУНТ методами темнопольной микроскопии и ПЭМ позволила показать возможность проникновения и накопления ОУНТ в клетках и А549, что может свидетельствовать о разных механизмах токсичности ОУНТ в отношении различных типов клеток.

Оценка профиброгенного потенциала ОУНТ показала, что на высокодозной цитотоксической концентрации (100 мкг/мл) отмечалось повышение уровня экспрессии гена остеопонтина в клетках BEAS-2B (Рисунок 5).

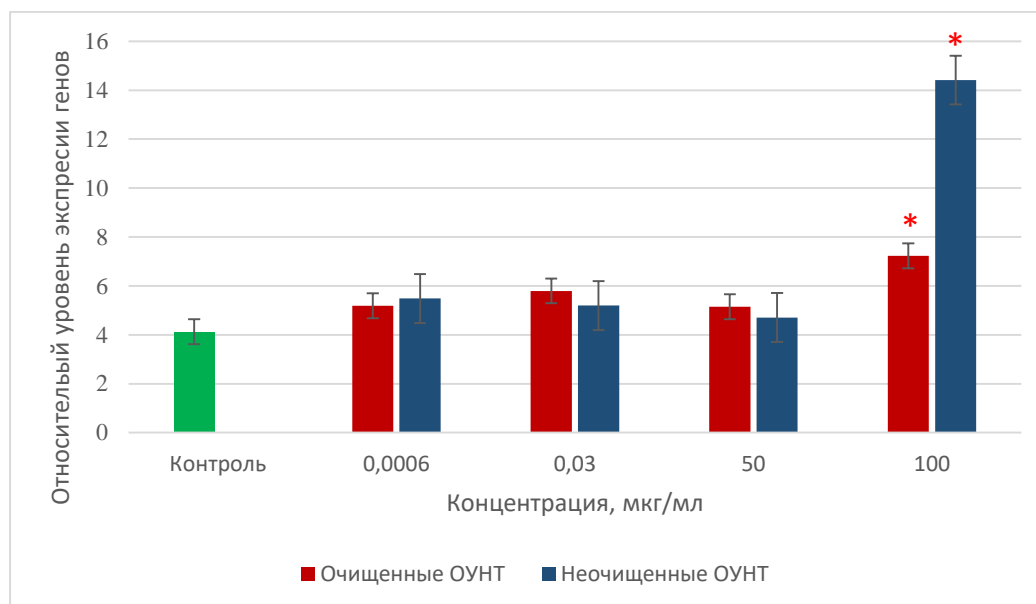


Рисунок 5 – Уровни экспрессии гена остеопонтина в клетках BEAS-2B; $\bar{X} \pm \sigma$; 72-часа экспозиции; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (клеточная среда).

Результаты теста ДНК-комет показали отсутствие признаков генотоксичности ОУНТ: генотоксическая активность обоих типов ОУНТ, исследованная на нецитотоксической концентрации (0,0006 мкг/мл) в отношении клеток BEAS-2B, статистически значимо не отличалась от отрицательного контроля – клеточной среды (Рисунки 6, 7).

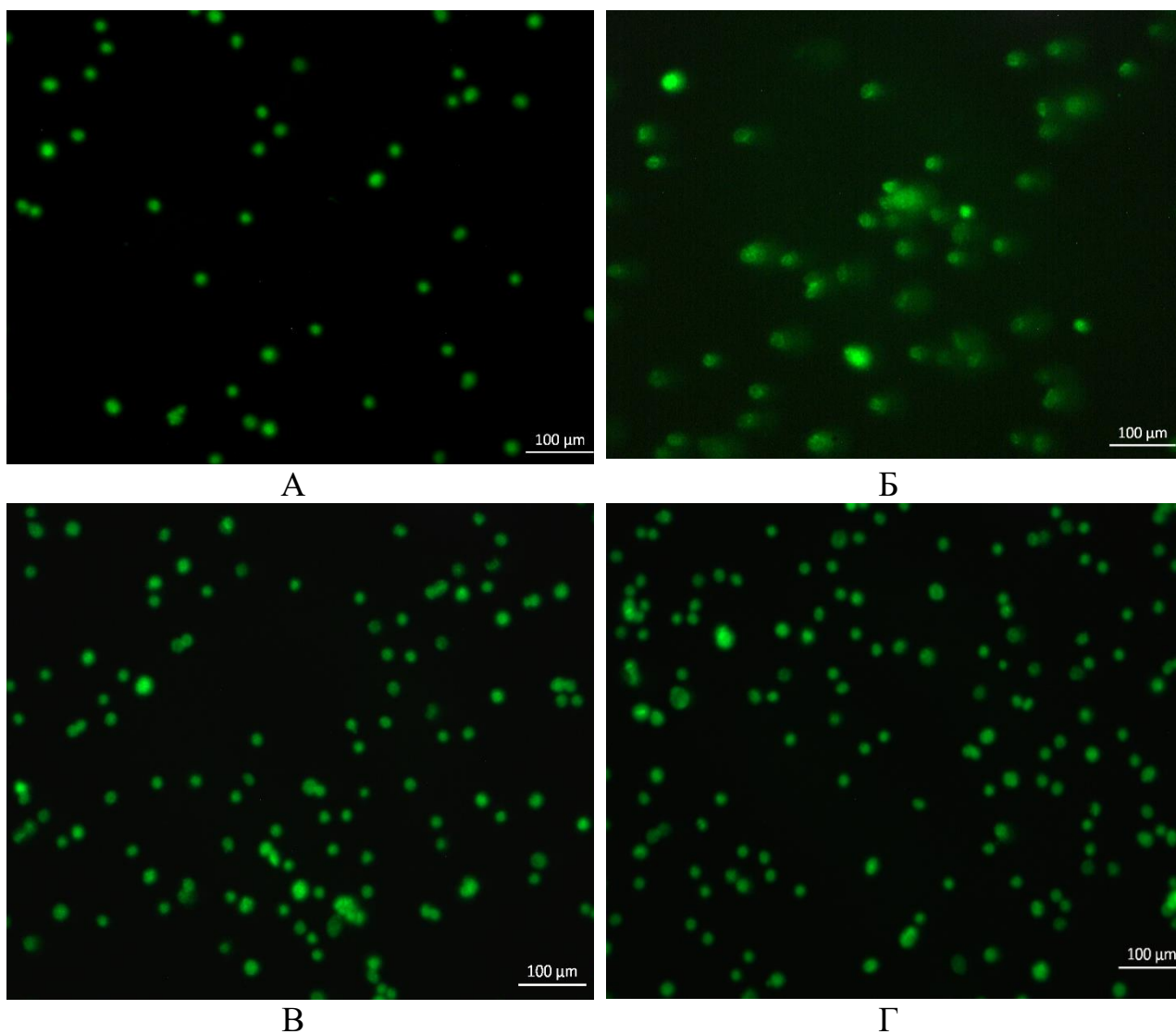


Рисунок 6 – Тест ДНК-комет. Флуоресцентная микроскопия клеток BEAS-2B: А – контроль (клеточная среда); Б – клетки BEAS-2B под действием доксорубина 1мМ (инкубация 8 часов); В – клетки BEAS-2B под действием очищенных ОУНТ, Г - клетки BEAS-2B под действием неочищенных ОУНТ в концентрации 0,0006 мкг/мл (инкубация 72 часа).

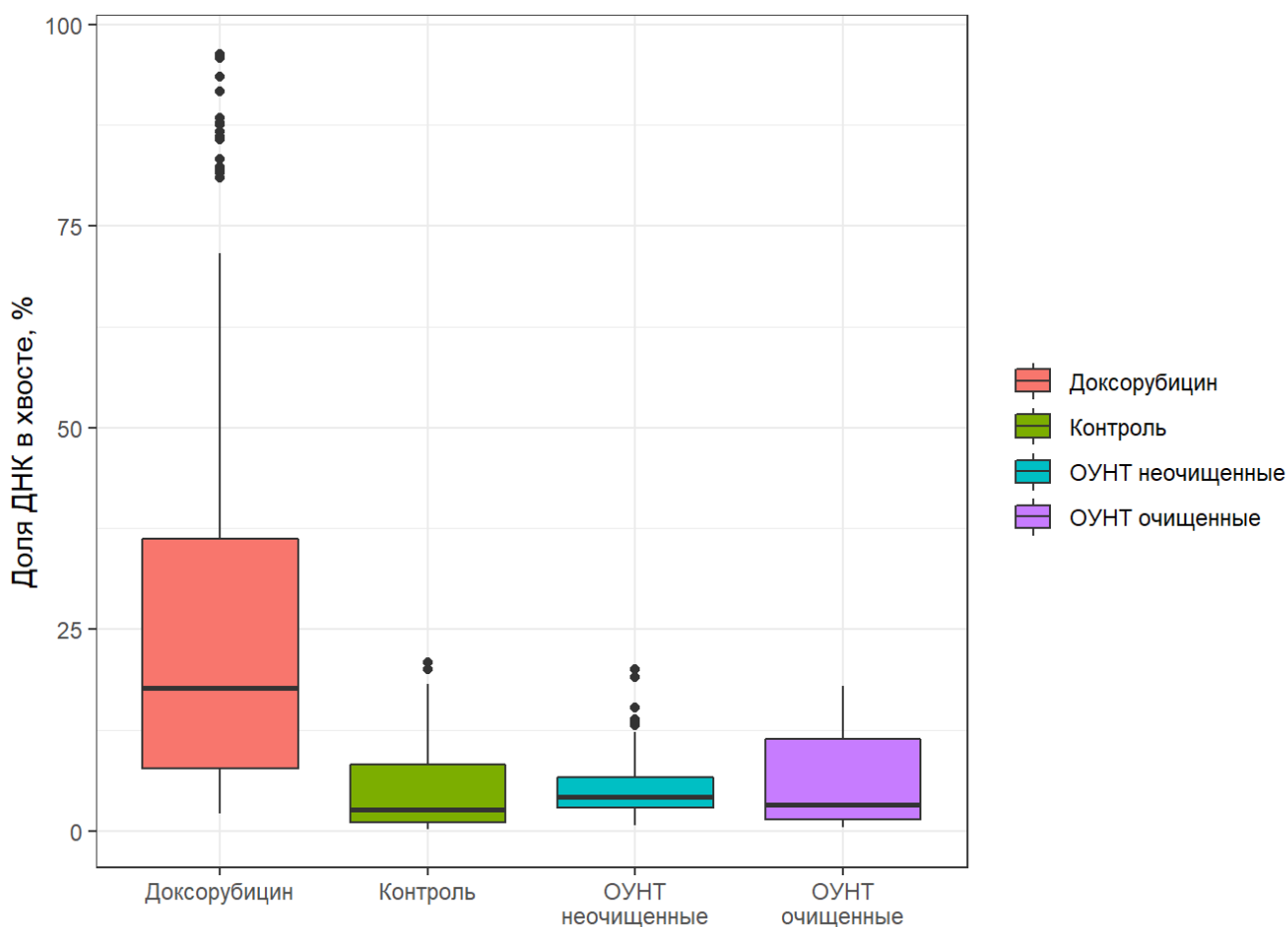
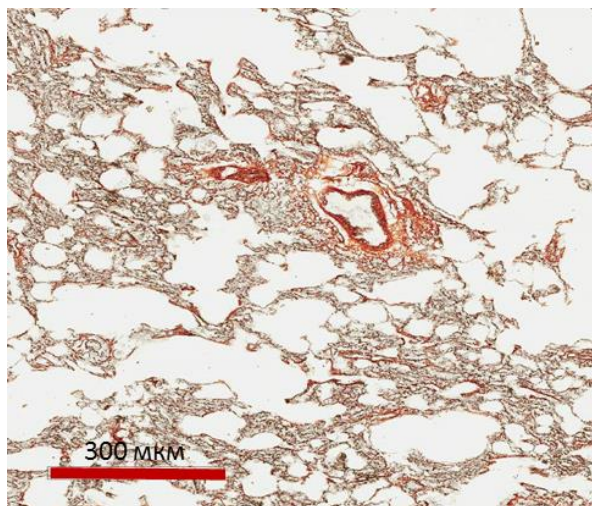
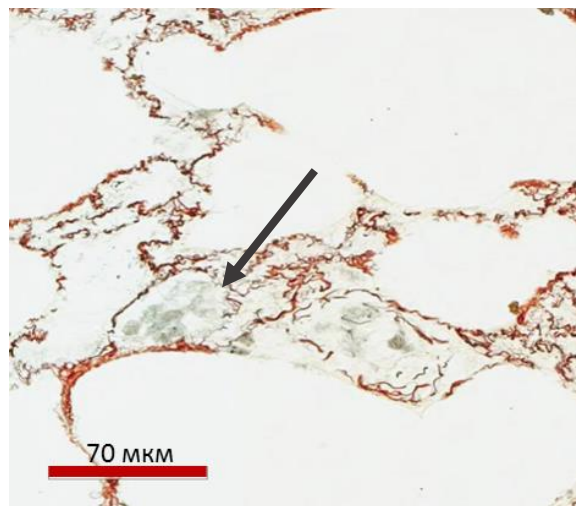


Рисунок 7 – Тест ДНК-комет. Доля ДНК в хвосте кометы (%) при воздействии очищенных и неочищенных ОУНТ на клеточную культуру BEAS-2B в концентрации 0,0006 мкг/мл, инкубация 72 часа; контроль – клеточная культура BEAS-2B без воздействия; доксорубицин – клетки BEAS-2B под воздействием доксорубицина 0,01мМ, инкубация 8 часов.

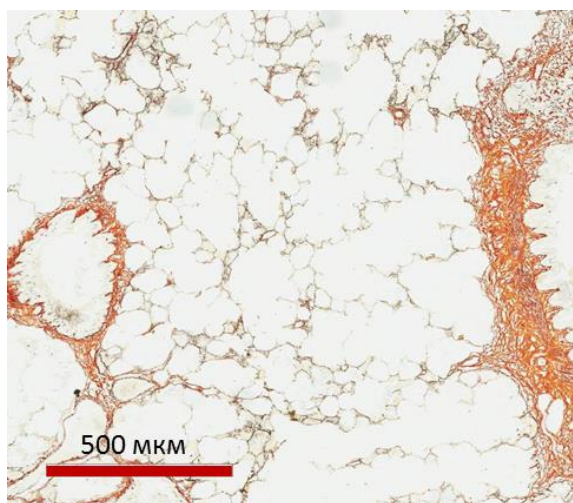
В экспериментах *in vivo* показано, что при дозе 1 мкг/крысу реакция легочной ткани крыс не отличалась от группы сравнения - в легких животных не обнаружено существенных изменений; тогда как при дозе, значительно превышавшей дозы, соответствующие производственным экспозициям (40 мкг/крысу), наблюдалась выраженная реакция легочной ткани в виде начальных признаков формирования клеточно-пылевых узелков в легких крыс (Рисунок 8).



1 мкг/крысу



40 мкг/крысу



Контроль

Рисунок 8 - Легкие крысы через 90 дней после однократного интратрахеального введения ОУНТ. Формирование клеточно-пылевого узелка с единичными аргирофильными волокнами (стрелка). Окр. серебрение по Гомори.

ВЫВОДЫ

1. На рабочих местах предприятия-производителя концентрация ОУНТ TUBALL™ в воздухе рабочей зоны не превышала 0,05 мкг/м³. Диапазон концентраций/доз для исследования обоснован с использованием компьютерного моделирования осаждения взвешенных частиц в различных отделах дыхательных путей человека или крысы с учетом производственных экспозиций и дисперсности аэрозоля ОУНТ. Для экспериментов *in vitro* диапазон концентраций составил 0,0001-200 мкг/мл, включая концентрации, соответствующие депонированию аэрозоля ОУНТ в легких человека за 25 лет стажа при концентрации ОУНТ в воздухе 1 мкг/м³, с расширением в сторону низких концентраций, соответствующих экспозициям на производстве, и высоких токсичных концентраций по данным научной литературы. Для экспериментов *in vivo* обоснованы дозы 1 мкг на крысу, аппроксимирующая депонирование ОУНТ в легких крысы при 90-дневном ингаляционном поступлении при концентрации ОУНТ в воздухе 1 мкг/м³, и 40 мкг на крысу как потенциально токсичная по данным научной литературы.

2. Разработан способ получения стабильных биосовместимых дисперсий ОУНТ TUBALL™, заключающийся в ультразвуковой соникации суспензий на основе дисперсионных агентов, содержащих белково-ростовые комплексы, в режиме 750 Вт, 20 кГц, 40% амплитуды, пульс 5/6, 30 минут. Способ позволил получить биосовместимые дисперсии с размером агломератов до 1000 нм для внесения в клеточные культуры и интратрахеальной инстилляцией экспериментальных животных.

3. Как очищенные, так и неочищенные ОУНТ TUBALL™ способны проникать в клетки дыхательных путей человека BEAS-2B и A549. В концентрации, соответствующей депонированию аэрозоля ОУНТ в легких человека за 25 лет стажа, ОУНТ не оказывали цитотоксического, апоптогенного, профиброгенного, генотоксического действия на культуры клеток дыхательной системы BEAS-2B, A549 и макрофаги RAW264.7. Токсические эффекты были обнаружены только в культуре клеток бронхиального эпителия BEAS-2B:

минимальная цитотоксическая концентрация ОУНТ по данным MTS-теста составила 25 мкг/мл; минимальная действующая концентрация, повышающая уровень экспрессии гена профиброгенного цитокина – остеопонтин в клетках BEAS-2B, равна 100 мкг/мл.

4. При интратрахеальной инстилляцией в дозе 1 мкг на крысу, соответствующей реальной производственной экспозиции, ОУНТ TUBALL™ не вызывают изменений со стороны легочной ткани крыс. Начальные признаки формирования соединительной ткани в легких крыс наблюдаются при интратрахеальной инстилляцией ОУНТ TUBALL™ в дозе 40 мкг на крысу, многократно превышающей производственные экспозиции.

5. Обоснование критериев безопасности ОУНТ должно проводиться с использованием методических подходов, включающих последовательное применение *in vitro* и *in vivo* методов. Определение уровней экспрессии гена остеопонтин, цитотоксических эффектов и генотоксичности с применением метода ДНК-комет при внесении биосовместимых дисперсий ОУНТ в культуру клеток бронхиального эпителия человека BEAS-2B рекомендуется применять в качестве скрининговых тестов для оценки токсичности ОУНТ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Производителям ОУНТ TUBALL™ рекомендуется 1 раз в 6 месяцев проводить мониторинг содержания ОУНТ в воздухе рабочей зоны. В ходе ежегодных медицинских осмотров рекомендуется накапливать банк биологических образцов (сыворотка крови, цельная кровь), с учетом получения от работников информированного согласия, для обеспечения возможности проведения проспективного биомониторинга.

2. Для предприятий, выпускающих продукцию на основе модифицированных ОУНТ TUBALL™, рекомендуется проводить токсиколого-гигиеническую оценку безопасности модифицированных ОУНТ с учетом гигиенической характеристики производственной экспозиции к ОУНТ в последовательных экспериментах *in vitro* и *in vivo* с применением совокупности

методов оценки профиброгенного, цитотоксического, генотоксического потенциала ОУНТ.

3. Для испытательных лабораторных центров учреждений Роспотребнадзора рекомендуется при оценке токсичности ОУНТ в качестве скрининговой модели *in vitro* использовать клеточную культуру BEAS-2B с изучением цитотоксичности методами МТС-теста и ЛДГ-теста, генотоксичности методом ДНК-комет, профиброгенного потенциала - методом оценки экспрессии гена остеопонтина.

4. Для контрольно-надзорных органов в области охраны труда и здоровья работников рекомендуется проведение профилактических визитов с целью информирования работодателей и работников, занятых в сфере производства и применения ОУНТ, о возможных потенциальных эффектах ОУНТ на здоровье и правилах безопасного обращения с ОУНТ.

5. Для образовательных медицинских учреждений высшего образования рекомендуется включение в программы дополнительного профессионального образования по дисциплинам общая гигиена, гигиена труда, коммунальная гигиена, гигиена питания, профилактическая токсикология модуля по этапам токсиколого-гигиенической оценки безопасности наноматериалов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Необходимы исследования по определению критериев безопасности различных типов ОУНТ на предприятиях, использующих ОУНТ в качестве добавки. Это позволит предприятиям-производителям ОУНТ разрабатывать программу производственного контроля и внедрять мониторинг за состоянием воздуха рабочей зоны.

Необходимо продолжать поиск и изучение новых биосовместимых диспергантов ОУНТ, имеющих минимальные ограничения при введении их в организм человека и животных.

Дальнейшее изучение клеточных реакций на разных типах клеток, в том числе 3D моделях, может способствовать выявлению фундаментальных механизмов действия разных типов ОУНТ, в том числе, для разработки скрининговых тестов для работающих в сфере производства и применения ОУНТ.

Проведение эпидемиологических исследований с участием работающих в сфере производства и применения ОУНТ следует рассматривать как следующий этап при оценке безопасности ОУНТ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фатхутдинова, Л. М. Токсические эффекты промышленных углеродных нанотрубок в экспериментах *in vitro* / Л. М. Фатхутдинова, Г. Ф. Габидинова, Г. А. Тимербулатова // Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни : сборник научных статей, Казань, 17–18 марта 2022 г. – Казань : ИД «МеДДоК», 2022. – С. 224-228.

2. Тимербулатова, Г. А. Методологические основы обоснования безопасных уровней воздействия искусственных наноматериалов (на примере углеродных нанотрубок) / Г. А. Тимербулатова // 16-й Российский Национальный Конгресс с международным участием Профессия и здоровье : материалы конференции, Владивосток, 21–24 сентября 2021 г. – Владивосток : НКО Ассоциация врачей и специалистов медицины труда, 2021. – С. 506-509. – DOI 10.31089/978-5-6042929-2-1-2021-1-506-509.

3. Фатхутдинова, Л. М. Методологические основы обоснования безопасных уровней воздействия искусственных наноматериалов (на примере корпоративного норматива) / Л. М. Фатхутдинова, Г. А. Тимербулатова // Актуальные гигиенические аспекты нанотоксикологии: теоритические основы, идентификация опасности для здоровья и пути ее снижения : материалы 2-ой Всероссийской научно-практической очно-заочной конференции с

международным участием, Екатеринбург, 20-21 октября 2021 г. – Екатеринбург : ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2021. – С. 38-40.

4. Сравнительная характеристика различных волокнистых материалов в экспериментах *in vitro* / Г. А. Тимербулатова, П. Д. Дунаев, А. М. Димиев [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2021. – Т. 102, № 4. – С. 501-509. – DOI 10.17816/KMJ2021-501.

5. Габидинова, Г. Ф. Принципы оценки генотоксичности углеродсодержащих наноматериалов *in vitro* (на примере углеродных нанотрубок) (обзор литературы) / Г. Ф. Габидинова, Г. А. Тимербулатова, Л. М. Фатхутдинова // Токсикологический вестник. – 2021. – Т. 29, № 6. – С. 16-23. – DOI 10.36946/0869-7922-2021-29-6-16-23.

6. Тимербулатова, Г. А. Методологические основы обоснования безопасных уровней воздействия искусственных наноматериалов (на примере углеродных нанотрубок) (обзор литературы) / Г. А. Тимербулатова, Л. М. Фатхутдинова // Токсикологический вестник. – 2021. – Т. 29, № 6. – С. 5-15. – DOI: 10.36946/0869-7922-2021-29-6-5-15.

7. Диспергирование одностенных углеродных нанотрубок в биосовместимых средах / Г. А. Тимербулатова, А. М. Димиев, Т. Л. Хамидуллин [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 461-469. – DOI 10.1134/S1992722320040160.

8. Оценка токсических свойств различных видов углеродсодержащих наноматериалов в экспериментах *in vitro* / Г. А. Тимербулатова, П. Д. Дунаев, С. В. Бойчук [и др.] // Научное сопровождение деятельности учреждений Роспотребнадзора: материалы Всероссийской научно-практической конференции, Екатеринбург, 23–25 октября 2019 г. – Екатеринбург : ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2020. – С. 136-138.

9. Fatkhutdinova, L. Exposure assessment and health effects of different types of carbon nanotubes / L. Fatkhutdinova, G. Timerbulatova, S.Boyчук [et al.] // Environmental and occupational health aspects related to nano- and ultrafine particulate matter : abstract book. – Norwegian Institute of Public Health, 2019. –P.

12-12. – URL:

https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/183628491/2019_abstract_book_final.pdf (дата обращения 05.09.2022).

10. Тимербулатова, Г. А. Фиброгенный потенциал одностенных углеродных нанотрубок / Г. А. Тимербулатова, Л. М. Фатхутдинова // Современные проблемы медицины труда: материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 80-летию академика РАН Н.Х. Амирова, Казань, 10 апреля 2019 г. – Казань : Казанский ГМУ; ФГБНУ «НИИ МТ», 2019. – С. 177-179. – DOI 10.31089/978-5-6042929-0-7-2019-1-177-179.

11. Абдрахманов, В. М. Исследование токсических свойств углеродных нанотрубок / В. М. Абдрахманов, Л. М. Фатхутдинова, Г. А. Тимербулатова // Белые цветы : Сборник тезисов 93-й Международной студенческой научно-практической конференции, 93-й Международной научно-практической конференции молодых ученых, 22-й Международной медико-исторической конференции студентов, посвященная 125-летию со дня рождения профессора В. А. Энгельгардта, I Всероссийской практической конференции «Слушаю. Вижу. Лечу», Казань, 10–12 апреля 2019 г. – Казань : Казанский государственный медицинский университет, 2019. – С. 74-75.

12. Тимербулатова, Г. А. Оценка цитотоксичности одностенных углеродных нанотрубок на клеточной культуре макрофагов RAW 264.7 и клетках бронхиального эпителия BEAS-2B / Г. А. Тимербулатова, П. Д. Дунаев, Л. М. Фатхутдинова // Медицина труда и промышленная экология. – 2019. – Т. 59, № 9. – С. 770. – DOI 10.31089/1026-9428-2019-59-9-770-771.

13. Генотоксичность одностенных углеродных нанотрубок: исследования на клеточных культурах / Г. А. Тимербулатова, Л. М. Фатхутдинова, Е. П. Бочаров [и др.] // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены : материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Москва, 24–26 октября 2018 г. – Москва : Русский Печатный Двор, 2018. – С. 433-437.

14. Тимербулатова, Г. А. Токсичность одностенных углеродных нанотрубок, исследованная на различных типах культур клеток (обзор современного состояния проблемы) / Г. А. Тимербулатова, Л. М. Фатхутдинова // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13, № 5-6. – С. 26-31.

15. Тимербулатова, Г. А. Методы *in vitro* для изучения ингаляционной токсичности углеродных нанотрубок / Г.А. Тимербулатова // Наноматериалы и живые системы. Nanomaterials and living systems. NLS–2018 : материалы 5-й Международной научно-практической конференции, Казань, 21–23 марта 2018 г. – Казань : Казанский ГМУ, 2018. – С. 38-39.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДСР – динамическое светорассеяние

МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки

ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

УНТ – углеродные нанотрубки

BEGM –Bronchial Epithelial Cell Growth Medium

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium