УДК 546.55/59 :546.81: 615.916

НОВЫЕ ДАННЫЕ К ВОПРОСУ ОБ ИНФОРМАТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ СРАВНИТЕЛЬНОЙ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТОКСИЧНОСТИ МЕТАЛЛООКСИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ Т.В. Бушуева¹, И.А. Минигалиева¹, В.Г. Панов², А.Н. Кузнецова¹, А.С. Наумова¹, М.П. Сутункова¹, В.Я. Шур³, Е.В. Шишкина³, В.Б. Гурвич¹, Б.А. Кацнельсон¹

 ¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий»
 Роспотребнадзора, 620014, г. Екатеринбург, Российская Федерация
 ²Институт промышленной экологии УрО РАН, 620990, г. Екатеринбург, Российская Федерация
 ³Институт естествознания и математики Уральского федерального университета, 620000, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Б золированное и комбинированное повреждающее действие наночастиц (НЧ) PbO и CuO оценены на стабильной линии человеческих фибробластов с помощью трёх различных показателей цитотоксичности, основанных на снижении (а) дегидрогеназной активности клеток (МТТ-тест); (б) содержания АТФ (тест на жизнеспособность культуры по интенсивности люминесценции); (в) интегральной оценки клеточной пролиферации, распластывания и прикрепления к поверхности по электрическому импедансу («нормализованный клеточный индекс»). По всем этим показателям продемонстрирована для обоих видов метало-оксидных наночастиц чёткая зависимость повреждения клетки от их концентрации, адекватно описываемая гиперболической функцией, в то время как при одном и том же уровне воздействия количественные характеристики цитотоксичности PbO-HЧ в сравнении с CuO-HЧ схожи. Последнее ранее наблюдалось и в субхроническом эксперименте на крысах. Математически описанная с помощью методологии построения поверхности отклика комбинированная цитотоксичность наночастиц in vitro найдена неоднозначной, что также согласуется с выводами из эксперимента на крысах с теми же наночастицами.

Ключевые слова: оксид свинца, оксид меди, наночастицы, токсичность in vitro.

Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией промышленной токсикологии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, ilzira-minigalieva@yandex.ru

Панов Владимир Григорьевич (Panov Vladimir Grigorievich), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории математического моделирования в экологии и медицине Института промышленной экологии УрО РАН, vpanov@ecko.uran.ru

Кузнецова Алиса Николаевна (Kuznetsova Alisa Nikolaevna), лаборант-исследователь НПО Лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, alisa@ymrc.ru

Бушуева Татьяна Викторовна (Bushueva Tatiana Victorovna), кандидат медицинских наук, заведующая Научно-производственным отделом Лабораторнодиагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, bushueva@ymrc.ru Минигалиева Ильзира Амировна (Minigalieva Ilzira Amirovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией

Наумова Анна Сергеевна (Naumova Anna Sergeevna), лаборант-исследователь НПО Лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, naumova@ymrc.ru

Сутункова Марина Петровна (Sutunkova Marina Petrovna), кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией токсикологии среды обитания ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, sutunkova@ymrc.ru

Шур Владимир Яковлевич (Shur Vladimir Yakovlevich), доктор физико-математических наук, профессор, директор Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», vladimir.shur@urfu.ru

Шишкина Екатерина Владимировна (Shishkina Ekaterina Vladimirovna), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Современные нанотехнологии» ФГАОУ ВПО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», ekaterina.shishkina@ labfer.usu.ru

Гурвич Владимир Борисович (Gurvich Vladimir Borisovich), доктор медицинских наук, директор ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, gurvich@ymrc.ru Кацнельсон Борис Александрович (Katsnelson Boris Aleksandrovich), доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом токсикологии и биопрофилактики ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, bkaznelson@etel.ru

Введение. Большинство опубликованных нанотоксикологических исследований проведено in vitro (главным образом, на культурах стабильных клеточных линий). Однако наша группа была, насколько нам известно, первой использовавшей подобные экспериментальные модели для оценки сравнительной и комбинированной токсичности наночастиц и поставившей вопрос о том, соответствует ли такая оценка получаемой в экспериментах in vivo [1,2]. Актуальность вопроса определяется тем, что многие металлургические, электросварочные и лазерные технологические процессы связаны с образованием аэрозолей конденсации, значительная фракция которых представлена наночастицами оксидов разных металлов (МеО-НЧ).

В частности, изученная в наших первых экспериментах комбинация Mn₂O₄-HЧ и NiO-HЧ, достаточно часто входит в состав сварочных дымов. В этих экспериментах мы показали, что повреждение клеток в различных культурах находится в количественной зависимости от концентрации MeO-HЧ, причём Mn₂O₄-HЧ найдены более цитотоксичными, чем NiO-HЧ, как это ранее было найдено по ряду неспецифических признаков токсичности in vivo. Принципиально совпали и оценки типологии комбинированной токсичности, которая для клеточных культур, как и во многих исследованиях на крысах (см. например, обобщения у [3,4] и др.) оказалась неоднозначной в зависимости от ряда факторов. Вместе с тем, предсказать на основании тестирования in vitro конкретный тип комбинированного действия той же самой пары MeO-HЧ in vivo оказалось невозможным. Поэтому мы высказали мнение, что хотя такие эксперименты и могут иметь прогностическое значение для ускоренной оценки сравнительной токсичности наночастиц этого класса, различающихся по составу, однако для характеристики их комбинированной токсичности исследования на системно-организменном уровне по-прежнему приоритетны.

Для подтверждения этого заключения, пока основанного лишь на одной серии экспериментов, мы выбрали другую пару МеО-НЧ, которая типична для загрязнения воздуха в медеплавильном производстве, а именно СиО-НЧ и РЬО-НЧ [4].

В специальной литературе можно найти немало данных для токсикологической характеристики CuO - НЧ, полученной на разных экспериментальных моделях ([5-17] и ряд других), в то время как токсикологическое изучение действия РЬО-НЧ началось значительно позднее [18-22]. В целом, эти исследования показывают, что наряду с типичным фактически для всех пока изученных МеО-НЧ широким спектром неспецефических эффектов, каждый из них вызывает in vivo некоторые важные эффекты, качественно специфичные для соответствующего металла в любой химической форме [4]. Так при субхронической интоксикации, развивающейся у крыс при повторных внутрибрюшинных введениях PbO-НЧ наблюдались типичные нарушения порфиринового синтеза и анемия [18], а при аналогичном воздействии CuO-HЧ - синдром, напоминающий болезнь Вильсона у человека [9]. Что же касается их комбинированной токсичности, нам известно только собственное исследование in vivo [18] и не найдено ни одной работы in vitro.

К сожалению, мы пока не нашли адекватный показатель действия на клеточную культуру, который соответствовал бы вышеназванным эффектам действия PbO-HЧ или CuO-HЧ на системно-организменном уровне. Тем не менее, заслуживает внимания и оценка их сравнительной и комбинированной неспецефической цитотоксичности для одной из тех клеток, которые наиболее часто используются в нанотоксикологических экспериментах in vitro, а именно для фибробласта.

Материалы и методы исследования.

Приготовление и характеристика наночастиц. Водные суспензии обеих МеО-НЧ были получены с помощью лазерной абляции мишеней соответствующего метала 99.9% чистоты под слоем де-ионизированной воды с последующим частичным упариванием при 50 °C в течение 5 часов для достижения концентрации 0,5 мг/мл.



Рис. 1. Суспензии СиО-НЧ (слева) и РbО-НЧ (справа). Сканирующая электронная микроскопия при увеличении *103 860 и *29 640, соответственно.

При сканирующей электронной микроскопии (Cross Beam Workstation Auriga производства Carl Zeiss, Germany) было показано, что частицы обеих суспензий имели сферическую форму (рис. 1) при среднем ±о диаметре 24,5±4,8 мкм для CuO-HЧ и 47,0±16,0 мкм для PbO-HЧ. Спектроскопия с помощью Рамановского конфокального микроскопа Alpha 300 AR (Germany) подтвердила, что эти наночастицы действительно состояли из CuO и PbO.

Отсутствие заметных изменений дзета-потенциала, а также очертания и положения пика плазмонного резонанса при наблюдении в течение 2 недель свидетельствовали о достаточной стабильности обеих нано-суспензий, которые в наших экспериментах приводились в контакт с клетками не позднее, чем через несколько дней после приготовления.

Культура клеток, параметры воздействия на них и оценка его эффектов.

Эксперименты проведены на стабильной линии ФЛЭЧ-104 Коллекции клеточных культур ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, Россия), которая представляет собой монослойную культуру фибробластоподобных клеток, полученную из лёгких 8-недельного эмбриона человека. Клеточную культуру поддерживали при 37°С в атмосфере 5% СО₂ в среде DMEM с L-глутамином, с содержанием глюкозы 1 г/л, добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,5% гентамицина.

Клетки высевали в 96-луночный планшет (ТРР Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) для тестирования дегидрогеназной активности или содержания АТФ и в 8-луночный планшет (ACEA Biosciences, San Diego, California, USA) для определения клеточного индекса по 70 000 клеток на лунку в объеме 100 мкл питательной среды для первых двух тестов или 300 мкл – для третьего и инкубировали в атмосфере 5% CO, при 37°C в течение 24 часов до добавления MeO-HЧs, инкубация с которыми проводилась в тех же условиях в течение следующих 24 часов. Конечная концентрация наночастиц в среде инкубации параллельно экспонированных проб составляла 50 – 75 – 100 – 200 мкг/мл. Все варианты экспозиции осуществлялись в четырёх повторностях.

Для количественной оценки цитотоксического эффекта этой инкубации использовались три показателя: содержание АТФ в культуре по люминесцентному сигналу, дегидрогеназная активность в МТТ-тесте и изменение нормализованного клеточного индекса.

Биолюминиесцентная АТФ-метрия проводилась с использованием реагентов CellTiter-Glo (Promega Corporation, USA). Рабочий раствор получали путем восстановления лиофилизированного CellTiter-Glo Substrate в CellTiter-Glo Buffer и подогревали на водяной бане до комнатной тем-

пературы. Этот раствор добавляли по 100 мкл в каждую лунку. Далее в течение 2 минут вращательными движениями перемещали планшет в одной плоскости, чтобы вызвать лизис клеток. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут измеряли свечение клеток с использованием люминометра LM-01T с программным обеспечением Kilia (Immunotech, Beckman Coulter Company, Praha, Czech Republic). Результаты измерения представлялись в единицах относительной интенсивности люминесценции relative luminescence units (RLU).

Для определения дегидрогеназной активности с помощью МТТ-теста, использовали жёлтый тетразолиевый краситель 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), который в живых клетках восстанавливается до пурпурного формазана. В качестве растворяющего компонента использовали диметилсульфоксид (ДМСО). В каждую лунку с клетками добавляли по 20 мкл красителя в концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 2 часов. После этого из планшетов полностью удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Epoch^{тм} (BioTek, Winooski, Vermont, USA) при длине волны 490 нм.

Оценку клеточного индекса осуществляли на клеточном анализаторе RTCA iCELLigence^{тм} ACEA Biosciences, San Diego, California, U.S.A) в реальном времени. Метод основан на том, что в присутствии клеток, активно прикрепившихся к сенсорной поверхности электрода, погружённого в индивидуальную лунку, и действующих как изолятор увеличивается электрический импеданс. Повреждение клеток, снижающее их способность к пролиферации и к прикреплению, снижает импеданс.

Результаты выражаются в виде нормализованного клеточного индекса (NCI) в соответствии с рекомендациями производителя (Calculation principles of RTCA Software, ACEA Biosciences, USA).

Математическое моделирование полученных данных.

Зависимость цитотоксического эффекта от концентрации наночастиц в культуре моделировалась тремя математическими функциями, которые представлялись возможными при первоначальной визуальной оценке расположения точек в осях концентрация (X) – показатель эффекта (Y), а именно: линейной $Y = b_0 + b_1 X$, лог-линейной $Y = \exp(b_0 + b_1 X)$ и гиперболической $Y = \frac{b_0 + b_1 X}{2}$

$$Y = \frac{b_0 + b_1 X}{b_2 + b_2 X}$$

Коэффициенты bi, подобранные по экспериментальным данным по критерию минимизации суммы квадратов отклонений, оказались статистически значимыми для всех трёх показателей в любой из моделей. Однако, судя по тому же критерию, наиболее близкую аппроксимацию зависимости эффектов от концентрации обоих MeO-HЧ давала гиперболическая модель, на которую мы и опираемся при обсуждении результатов исследования.

Как и в большинстве наших ранее проведенных исследований по анализу закономерностей двухфакторной комбинированной токсичности ([1,4,24] и др.), мы и в этой работе использовали метод построения поверхности отклика (the Response Surface Methodology - RSM).

Уравнение регрессии, описывающее функцию отклика Y (x1, x2), в нашем случае имеет вид:

$$Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (1),$$

где Y есть тот или иной показатель цитотоксичности, x_1 и x_2 - дозы CuO-HY и PbO-HY, соответственно. Постоянный член уравнения b_0 , коэффициенты регрессии для каждой независимой переменной b_1 , b_2 и коэффициент регрессии для их комбинации b12 подбирались по экспериментальным данным на основе того же критерия наименьшей суммы квадратов отклонений.

Принимается, что комбинированное действие двух факторов является однонаправленным, если ответ Y в обеих однофакторных функциях Y(x_1 , 0) и Y(0, x_2) возрастает или снижается с увеличением x_1 или x_2 , и противоположно направленным - если Y в одной функции при этом возрастает, а в другой – снижается. Теория метода RSM показывает, что даже на основе эксперимента, в котором использовались только по два уровня каждого воздействия, уравнение (1) позволяет прогнозировать значение Y для любой комбинации x₁ и x₂ в пределах этих уровней.

Результаты и их обсуждение. Наличие количественной зависимости между силой предположительно вредного внешнего воздействия на живую систему (например, дозой или концентрацией токсиканта) и величиной измеряемого показателя состояния этой системы является теоретически важным аргументом в пользу того, что сдвиг этого показателя действительно является эффектом указанного воздействия. Вместе с тем, анализ типа зависимости доза (концентрация)-эффект имеет и практическое значение как в сфере задач оценки рисков для здоровья и управления ими, так и в экспериментальной токсикологии для выбора диапазона доз, в котором имеет смысл проведение тех или иных исследований. В частности, для экспериментального моделирования комбинированной токсичности двух МеО-НЧ на клеточной культуре представляется наиболее целесообразным использовать такие концентрации каждого из них, которые при изолированном воздействии явно эффективны по используемому показателю, причём даже относительно небольшое увеличение концентрации заметно усиливает сдвиг этого показателя.

Именно поэтому первым этапом нашего исследования было экспериментальное и математическое моделирование однофакторных зависимостей доза-эффект по каждому из трёх использовавшихся показателей цитотоксичности. Как уже было указано выше, наиболее близкой аппроксимацией экспериментально найденной зависимости во всех случаях оказалась гиперболическая функция. Это подтверждает ту хорошо известную общую закономерность, что хотя зависимость токсического эффекта от дозы и может казаться квази-линейной, но только в ограничен-



Рис. 2. Зависимость цитотоксического эффекта, оцененного по снижению дегидрогеназной активности (DHA) в МТТтесте и выраженного в %% контрольного показателя (на оси ординат) от действующей концентрации (а) CuO-HY или (б) PbO-HY (на оси абсцисс в мкг/мл). Кривые – геометрическая интерпретация приведенных уравнений, точки – средние арифметические значения показателя эффекта с 95%-ными доверительными интервалами.

ном диапазоне доз. В этом отношении, результаты настоящего исследования в принципе совпадают с результатами предыдущего, проведенного на клеточных культурах с NiO-HЧ и Mn₃O₄-HЧ [1]. Для сокращения объёма статьи мы иллюстрируем рассматриваемую аппроксимацию примерами, относящимися только к оценке цитотоксичности по снижению дегидрогеназной активности культуры клеток, измеренной в МТТ-тесте как для CuO-HЧ, так и для PbO-HЧ (рис. 2).

При одном и том же уровне экспозиции цитотоксичность наночастиц PbO и CuO была количественно сопоставимой подобно тому, как это было ранее показано в отношении ряда неспецифических показателей действия тех же наночастиц in vivo [18].

Отметим, что не только тип рассматриваемой зависимости, но и эффективный дозовый диапазон оказался фактически одним и тем же для трёх разных показателей эффекта. Это косвенно подтверждает, что несмотря на разные ближайшие биохимические и биофизические механизмы изменения этих показателей, все три отражают степень цитотоксичности. Вместе с тем, выявленный в этом диапазоне тип комбинированной цитотоксичности оказался отчасти зависящим от того, по какому показателю она оценивалась.

Действительно, как видно из изоболограмм, полученных с помощью методики построения поверхности отклика (рис. 3), этот тип фактически один и тот же при оценке цитотоксического эффекта с помощью MTT - теста и нормализованного клеточного индекса (НКИ), в обоих случаях свидетельствуя об аддитивности однонаправленного действия с некоторой тенденцией к субаддитивности. Однако, судя по показателю снижения люминесцентной активности, заключение о типе комбинированного действия изученных МеО-НЧ далеко не так однозначно. В этом случае субаддитивный тип однонаправленной комбинированной токсичности проявился только при низших дозах обоих агентов, в то время как при более высоких дозах хотя бы одного из них мы видим разные варианты противонаправленного действия.

Необходимо подчеркнуть, что как в целом ряде экспериментов in vivo (см. обобщения [4, 25]), так и в предыдущем исследовании на клеточных культурах [1] мы обосновали в качестве одной из парадигм теории комбинированной токсичности именно неоднозначность её типологии для одной и той же пары токсикантов в зависимости, прежде всего, от оцениваемого эффекта, а также от его уровня и от соотношения действующих доз. Примеры такой неоднозначности представлены на рис. 4 изоболограммами, которые были построены при анализе данных экспериментов in vivo как раз с комбинацией [СиО-НЧ + PbO-HЧ], но в опубликованной по его результатам статье [19] не приводились.

Из множества таких изоболограмм мы привели на рисунке 4 примеры только тех, которые по форме и наклону изобол схожи с типологией комбинированной цитотоксичности, выявленной на клеточной культуре (рис. 3). В частности, здесь видны: аддитивность однонаправленного действия на число тромбоцитов; некоторая тенденция к субаддитивности однонаправленного действия на общую двигательную активность крысы (судя по числу квадратов, пересеченных за 3 мин); и характерная зависимость типа комбинированной токсичности, оцененной по повышению концентрации мочевой кислоты в крови, от уровня эффекта и соотношения доз. В последнем случае она варьирует от антагонизма (в виде субаддитивности однонаправленного или даже противонаправленности действия) до синергизма (супераддитивности).

Мы привели также одну из изоболограмм, построенных по показателям цитологической характеристики жидкости, полученной при бронхоальвеолярном лаваже через 24 часа после однократного интратрахеального введения тех же наносуспензий раздельно или в комбинации (рис. 4г). Конкретно речь идёт о показателе отношения числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов (НЛ/АМ), которое, как давно показано (начиная с [26]) хорошо коррелирует с цитотоксичностью различных частиц для макрофага in vitro. Поэтому интересно, что и по этому показателю комбинированное действие СuO-HЧ и PbO-HЧ in vivo оказалось явно аддитивным.

Таким образом, вариабельность типологии комбинированного цитотоксического действия CuO-HЧ и PbO-HЧ, выявленная in vitro, в целом схожа с её вариабельностью in vivo на системно-организменном уровне. То же самое было показано нами и при сопоставлении аналогичных экспериментальных моделей комбинированной токсичности NiO-HЧ и Mn_3O_4 -HЧ [1]. Мы видим в этом новое подтверждение того, что неоднозначность типа комбинированной токсичности действительно может рассматриваться как парадигма общей токсикологической теории.

В том частном случае, который рассматривается в настоящей статье, можно высказать также гипотезу, что совпадение типа комбинированного действия in vitro по эффектам МТТ теста и нормализованного клеточного индекса (НКИ) при отличии этого типа по эффекту снижения интенсивности люминесцентного сигнала не случайны, а связаны со схожестью или несхожестью механизмов развития этих эффектов. Действительно, потеря дегидрогеназной активности, выявляемая в МТТ -тесте, отража-



Рис. 3. Изоболограммы, характеризующие комбинированное цитотоксическое действие наночастиц CuO-HY и PbO-HY на культуру фибробластов, оцениваемое по снижению: (а) интенсивности люминесцентного сигнала, (б) дегидрогеназной активности в МТТ-тесте и (в) нормализованного клеточного индекса. Числа на осях – концентрации соответствующих MeO-HY в мкг/мл, числа на изоболах – уровни эффекта, которым соответствует данная изобола.



Рис. 4. Изоболограммы, характеризующие комбинированное токсическое действие наночастиц CuO-H4 и PbO-H4 на крысу, оценивавшееся после повторных внутрибрюшинных инъекций по (а) увеличению числа тромбоцитов в крови (б) уменьшению числа квадратов, пересеченных за 3 мин; (в) увеличению концентрации мочевой кислоты в крови, а после однократной интратрахеальной инстилляции - (г) по увеличению отношения числа нейтрофильных лейкоцитов к числу альвеолярных макрофагов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Числа на осях – дозы соответствующих MeO-H4 в долях от максимальной использованной, числа на изоболах – уровни эффекта, которым соответствует данная изобола.

ет гибель клеток, но эта же самая гибель ведёт и к отлипанию клеток с поверхности электрода и тем самым к снижению показателя НКИ. В отличие от этого, интенсивность люминесценции клеточной культуры отражает содержание АТФ в жизнеспособных клетках, которое зависит от процессов окислительного фосфорилирования. Последние же могут угнетаться в разной степени, а возможно, и усиливаться в части клеток культуры под активирующим влиянием продуктов разрушения других.

Заключение.

1. Вредные эффекты изолированного действия наночастиц PbO и CuO на культуру фибробласто-подобных клеток, количественно оцененные по трём разным показателям цитотоксичности, находятся в однотипной зависимости от концентрации этих MeO-HЧ, причем в практически реальном диапазоне концентраций эта зависимость может быть ближе всего аппроксимирована гиперболической функцией.

2. При одном и том же уровне экспозиции цитотоксичность наночастиц PbO и CuO была количественно сопоставимой подобно тому, как это было ранее показано в отношении ряда неспецифических показателей действия тех же наночастиц in vivo.

3. Типы комбинированной цитотоксичности изученных метало-оксидных наночастиц варьируют в зависимости от использованного показателя эффекта, а для одного из них – также от дозового соотношения, и в этом отношении мы также видим подтверждение выводов, ранее обоснованных в экспериментах с другой парой метало-оксидных наночастиц, а именно NiO-HЧ и Mn₃O₄-HЧ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES:

1. Minigalieva, I.A., Bushueva, T.V., Froehlich, E., Meindl C., Panov V.G, Varaksin A.N, Shur V. Ya, Shishkina E.V., Gurvivh V.B., Katsnelson B.A. Are in vivo and in vitro assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition of data obtained in respective experiments with NIO and Mn3O4 nanoparticles. Food Chem. Toxicol. 2017: 109: 393-4

 Минигалиева И.А., Бушуева Т. В., Панов В. Г., Вараксин А.Н., Шур В.Я., Шишкина Е.В., Гурвич В.Б., Кацнельсон Б.А. Некоторые аспекты оценки токсичности металло- оксидных наночастиц на клеточных культурах (на примере NiO и Mn304). Токсикологический вестник. 205: 35-43.

 Minigalieva I.A., Bushueva, T.V., Panov V.G., Shur V. Ya, Shishkina E.V., Gurvivh V.B., Katsnelson B.A. Some aspects of metal oxide nanoparticles toxicity assessment on cell cultures as exemplified by NiO and Mn3OToxicological Review. 205: 35-43 (in Russian).

4. Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., Gurvich V.B., Shur V.Y., et al. Experimental research into metallic and metal oxide nanoparticle toxicity in vivo, In: B. Yan, H. Zhou, J. Gardea-Torresdey (Eds.). "Bioactivity of Engineered Nanoparticles", Springer; 2017; Chapter 11: 259-319.

 Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. Chem. Res. Toxicol. 2008; 21: 1726-1732.
 Studer, A.M., Limbach, L.K., van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E.K., Gerber, L.C., Moch, H., Stark, W.J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. Toxicol. 2010; Lett. 1: 169–174.

 Cronholm, P., Karlsson, H.L., Hedberg, J., Lowe, T.A., Winnberg, L., Elihn, K., Wallinder, I.O., Möller, L. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. Small. 2013; 8: 970-982.
 Cuillel, M., Chevallet, M., Charbonnier.

D. Soumo, M., Oneotac, M., Matoom, M., P., Fauquant, C., Pignor-Paintrand, I., Arnaud, J., Cassio, D., Michaud-Soret, I., Mintz, E. Interference of CuO nanoparticles with metal homeostasis in hepatocytes under sub-toxic conditions. Nanoscale. 2014; 16: 1707–1715.

9. Privalova L.I., Katsnelson B.A., Loginova N.V., Gurvich V.B., Shur V.Y., Valamina I.E., et al. Subchronic Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles and Its Attenuation with the Help of a Combination of Bioprotectors. Int J Mol Sci. 2014: 15: 12379-12406. 10. Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. Environ. Pollut. 2012; 169: 81-89. 11. Pang, C., Selck, H., Misra, S.K. Berhanu, D., Dybowska, A., Valsami-Jones, E., Forbes, V.E. Effects of sedimentassociated copper to the deposit-feeding snail, Potamopyrgus antipodarum: A comparison of Cu added in aqueous for or as nano- and micro-CuO particles. Aquat. Toxicol. 2012; 15: 114-122. Magaye, R., Zhao, J., Bowman, L. Ding, M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. Exp. Ther. Med. 2012; 4: 551-561.

13. Liao, M., Liu, H. Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral

administration. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012; 34: 67–80.

14. Xu, J., Li, Z., Xu, P., Xiao, L., Yang, Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. Arch. Toxicol. 2013; 87: 1067–1073.

15. Sizova, E., Miroshnikov, S., Polyakova, V., Gluschenko, N., Skalny, A. Copper nanoparticles as modulators of apoptosis and structural changes in tissues. J. Biomater. Nanobiotechnol. 2012; 3: 97-104.

16. Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel Mytilus galloprovincialis. Mar. Environ. Res. 2013; 84: 51–59.

 Alarifi, S., Ali, D., Verma, A., Alakhtani, S., Ali, B.A. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. Int. J. Toxicol. 2013; 32: 296–307.

18. Minigalieva, I.A., Katsnelson, B.A., Panov, V.G., Privalova, L.I., Varaksin, A.N., Gurvich, V.B., Sutunkova, M.P., Shur, V.Ya., Shishkina, E.V., Valamina, I.E., Zubarev, I.V., Makeyev, O.H., Meshtcheryakova, E.Y., Klinova, S.V. In vivo toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors. Toxicology. 2017; 380: 72-93

 Amiri, A., Mohammadi, M., Shabani, M. Synthesis and Toxicity Evaluation of Lead Oxide (PbO) Nanoparticles in Rats.
 Electronic J Biol. 2016; 12(2): 110-114.
 Dumková, J., Smutná, T., Vrlíková, L., Le Coustumer, P., Večeřa, Z., Dočekal, B., Mikuška, P., Čapka, L., Fictum, P., Hampl, A., Buchtová M. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs.
Part Fibre Toxicol. 2017; 14(1):
21. Miri, A., Sarani, M., Hashemzadeh, A., Mardani Z., Darroudi, M., 20Biosynthesis and cytotoxic activity of lead oxide nanoparticles. Green Chemistry Letters and Reports. 2018; 11(4): 567-572.
22. Ng, D., Chu, Y., Tan, S., Wang, S., Lin, Y., Chu, C., Soo, Y., Song, Y., Chen, P. In vivo evidence of intestinal lead dissolution from lead dioxide (PbO2) nanoparticles and resulting bioaccumulation and toxicity in medaka fish. Environ. Sci.: Nano. 2019; 6: 580-5

23. Cimpan, M.R, Mordal, T., Schölermann J., Allouni Z.E., Pliquett U., Cimpan, E. An impedance-based high-throughput method for evaluating the cytotoxicity of nanoparticles. Journal of Physics: Conf. Ser. 2013; 429, 012026.

24. Varaksin A.N., Katsnelson B.A. Panov V.G., Privalova L.I., Kireyeva E.P., Valamina I.E., et al. Some considerations concerning the theory of combined toxicity: a case study of subchronic experimental intoxication with cadmium and lead. Food Chem Toxicol, 2014: 64: 144-156 25. Minigalieva I.A., Katsnelson B.A. Panov V.G., Varaksin A.N., Gurvich V.B., Privalova L.I., et al. 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 (Russia). Toxicol Rep. 2017; 4C: 194-201. Privalova, L.I., Katsnelson, B.A. Osipenko, A.B., Yushkov, B.H., Babushkina, L.G. Response of a phagocyte cell system to products of macrophage breakdown as a probable mechanism of alveolar phagocytosis adaptation to deposition of particles of different cytotoxicity. Environ. Health Perspect. 1980: 35: 205-218.

*T.V. Bushueva*¹, *I.A. Minigalieva*¹, *V.G. Panov*², *A.N. Kuznetsova*¹, *A.S. Naumova*¹, *M.P. Sutunkova*¹, *V.Ya. Shur*³, *E.V. Shishkina*³, *V.B. Gurvich*¹, *B.A. Katsnelson*¹

NEW DATA ON THE QUESTION OF INFORMATIVENESS OF EXPERIMENTS ON CELL CULTURES FOR ASSESSMENT OF COMPARATIVE AND COMBINED TOXICITY OF METAL OXIDE NANOPARTICLES

¹Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 620014, Ekaterinburg, Russian Federation ²Institute of Industrial Ecology, Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, 620990, Ekaterinburg, Russian Federation ³ School of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University, 620000, Ekaterinburg, Russian Federation

Isolated and combined damaging effects of PbO and CuO nanoparticles have been estimated on an established line of human fibroblasts using three different cytotoxicity indices based on reduction in: (a) the cellular dehydrogenase activity (MTT Assay), (b) the ATP content (Luminescent Cell Viability Assay), (c) the cellular proliferation, viability, spreading, and attachment to substrate evaluated integrally by continuous impedance-based measurement of the Normalized Cell Index. For all these indicators a clear dependence of cell damage on concentration of metal oxide nanoparticles has been demonstrated for both types of metal oxide nanoparticles, which is adequately described by the hyperbolic function, while at the same level of exposure the quantitative characteristics of cytotoxicity of PbO-NPs in comparison with CuO-NPs are similar. The latter was previously observed in the subchronic experiment on rats. The combined in vitro cytotoxicity of nanoparticles has been also described mathematically using the response surface construction methodology and found to be ambiguous, which is also consistent with the conclusions from the experiment on rats with the same nanoparticles.

Keywords: lead oxide, copper oxide, nanoparticles, in vitro toxicity.