МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПЫЛЕЙ «*IN VITRO*»

Лукьяненко А. О.

Институт электросварки имени Е. О. Патона Национальной академии наук Украины, г. Киев

Вступление. Наряду с поиском эффективных методов борьбы с пылеобразованием и методов биологической профилактики пылевых заболеваний легких, актуальное значение сохраняют задачи прогнозирования вредного действия на организм промышленных аэрозолей, в частности, разработка менее трудоемких и затратных экспресс-методов скрининговой оценки токсичности сварочных аэрозолей.

Цель исследования — обосновать необходимость создания методики экспресс-оценки токсичности сварочных аэрозолей.

Материалы и методы исследования. Аналитический обзор научных публикаций был проведен с использованием иностранных профильных изданий, текстовой базы данных PUB MED, базы данных Национальной научной медицинской библиотеки и Национальной библиотеки Украины имени В. И. Вернадского.

Результаты. Рассмотрены методы определения токсичности промышленных аэрозолей. Обоснована необходимость для создания экспресс-оценки токсичности сварочных аэрозолей. Новый экспресс-метод определения токсичности использует доступный, дешевый и стандартный биологический материал, который позволяет исследовать нестерильные вытяжки и получать результаты за время, не превышающее 3 часа.

Выводы. Новый экспресс-метод оценки токсичности может расширить возможности прогнозирования цитотоксических свойств сварочных аэрозолей, которые имеют в своем составе высокотоксичные компоненты широкого спектра действия.

Ключевые слова: методы *in vitro*, воздух рабочей зоны, цитотоксичность, промышленная пыль, сварочный аэрозоль

Для целей гигиенической характеристики промышленных пылей по-прежнему широко используются хронические экспериментальные исследования, но такие эксперименты требуют больших временных и материальных затрат, что делает актуальным создание набора адекватных краткосрочных тестов «*in vivo*» и «*in vitro*». Основным преимуществом применения систем «*in vitro*» является то, что они позволяют получать научно обоснованные результаты, которые могут применяться не только на практике, но и в развитии фундаментальных основ. Также методы «в пробирке» — это идеальный способ малозатратного (быстрого и недорогого) получения точных результатов, без использования лабораторных животных, что позволяет соблюдать этические нормы [1]. В связи с недостаточным знанием факторов токсичности, модели «*in vivo*» могут быть использованы для изучения показателей, которые не доступны при исследовании систем «*in vitro*» (распределение в органах и тканях, выведение из организма, метаболизм и др.). В свою очередь, информация, полученная на альтернативных токсикологических моделях «*in vitro*», может служить «вектором» для проведения углубленных экспери-

ментальных исследований. В частности, использование систем «*in vitro*» для оценки нанотоксичности одобрено Европейским центром валидации альтернативных методов ЕС [2].

Следует отметить, что осуществление токсикологических исследований аэрозолей сложного состава в хронических опытах на животных лимитируются их длительностью (4–6 мес. и более), а также трудоемкостью. При необходимости оценки биологической активности аэрозолей, состав и физико-химические свойства которых не постоянны и способны изменяться во времени (коагуляция, окисление, десорбция газов с поверхности частиц и др.), такие исследования становятся малоинформативными. Это определяет актуальность разработки и использования новых, альтернативных методов ускоренной оценки токсичности и биологической опасности аэрозольных загрязнений. К их числу относят способы, основанные на использовании в качестве биологической модели культур соматических клеток человека и млекопитающих.

Не уменьшая роли традиционных токсикологических исследований, данные, полученные с помощью использования экспресс-методов (исследования

цитотоксичності), надають попередню інформацію про токсичність нових матеріалів. Використання так званих альтернативних токсикологічних моделей «*in vitro*» (культури клітин, експрес-тестів тощо) дозволяє отримувати інформацію про токсичність і небезпечність хімічних сполук і матеріалів менш затратними способами або методами, в короткі терміни і більш гуманно з позицій біоетики порівняно з традиційними методами експериментальних досліджень на лабораторних тваринах.

На сьогоднішній день не існує універсальної тест-системи, здатної виявити всі можливі ефекти того чи іншого матеріалу однаково добре. Тому на практиці все більш широке застосування знаходять набори тестів, включаючи використання різних тест-об'єктів (соматичних і статевих клітин млекопитаючих, бактерій, водорослей, простіших, ракоподібних, риб, рослин тощо).

В даний час для визначення токсичності промислових пилей відомі способи порівняльної оцінки цитотоксичності «*in vitro*» шляхом вимірювання певних показників (активності ферментів-маркерів, хемілюмінесценції, життєспроможності по невключенню спеціального фарбника, гемолітичної активності) в культурах ізолюваних макрофагів, еритроцитів при інкубації їх з знову досліджуваними і з відомими своєю високою або низькою цитотоксичністю пиловими частинками. Існує ряд методів [3, 4, 8–12], заснованих на різних ефектах дії пилових частинок на клітинну культуру.

В частині, спосіб визначення цитотоксичності малорастворимих пилей, включаючи інкубацію мишиних перитонеальних макрофагів з рівними дозами різних пилей і реєстрацію вимірювання активності фермента-маркера порівняно з контролем, відрізняється тим, що, з метою підвищення точності способу як як фермента-маркера використовують 5'-нуклеотидазу, а о цитотоксичності судять по зниженню активності 5'-нуклеотидазы [3].

Для визначення цитотоксичності пилової суспензії визначають ступінь викликаного їй подавлення активності 5'-нуклеотидазы при короткотривалій інкубації з культурою мишиних перитонеальних макрофагів. Разом з тим, для пилей проміжного діапазону тест на зниження активності 5'-нуклеотидазы може виявити

різницю там, де вони виявляються на основі інших методів оцінки цитотоксичності пилі для клітинної культури.

Метод стосується порівняльної експериментальної оцінки здатності пилових частинок до пошкодження макрофагів, як як одного з підходів прискореної гігієнічної регламентації промислових аерозолів. Цей спосіб завдяки односторонності впливу на активність даного фермента обох взаємопов'язаних ефектів дії цитотоксичних пилей на культуру макрофагів (тобто, як їх пошкодження, так і їх активації) вільний від тих спотворень шкали порівняльної цитотоксичності різних пилей, які може дати спосіб-прототип [3].

Однак даний метод має і ряд недоліків, зокрема, — це використання перитонеальних макрофагів миші, що в свою чергу являється дуже затратним і трудомістким, займаючи достатньо тривале час для оцінки цитотоксичності пилі.

В свою чергу, спосіб визначення цитотоксичності малорастворимих промислових пилей, включаючи інкубацію людських еритроцитів з рівними дозами різних пилей, реєстрацію вимірювання в стандартному водному розчині окислювально-відновлювального потенціалу (ОВП). Показателем цитотоксичності при дії визначеної дози пилі на культуру еритроцитів є виражене в відсотках підвищення середнього за період інкубації рівня ОВП по порівнянню з середнім рівнем ОВП в активованій стандартній воді при впливі контрольної еритроцитарної суспензії без пилі [4]. Цей дослідження проводиться на вимірному комплексі «ІКАР-ТЕСТ» для безконтактної реєстрації динаміки фізичних, хімічних і біохімічних процесів в водних розчинах [5].

Спосіб значно спрощує технологію визначення цитотоксичності малорастворимих пилей і дає можливість оцінювати динаміку процесу, що відбувається в результаті взаємодії мембрани еритроцита з пиловими частинками.

Завданням є реалізація простого, чутливого і широкодоступного способу порівняльної оцінки цитотоксичності пилей. Ця задача вирішується завдяки використанню як як показателя цитотоксичності при дії визначеної дози пилі на культуру еритроцитів —

повышение уровня окислительно-восстановительного потенциала в активированном эталонном водном растворе. Предложенный способ основан на использовании известного эффекта бесконтактной активации эталонного водного раствора за счет излучения от исследуемого раствора, переведенного в термодинамически неравновесное состояние физическими, химическими или биологическими процессами. Бесконтактное воздействие наблюдается через полимерные, химически инертные диэлектрические перегородки, в результате в эталонном водном растворе при неизменном химическом составе регистрируются сдвиги окислительно-восстановительного потенциала [5–7].

Таким образом, данный способ по своей чувствительности и информативности не уступает наиболее широко применяемому прототипу, каким является оценка цитотоксичности пыли по гемолитической активности колориметрическим методом. При этом отсутствие в новом способе действий, связанных с предварительным троекратным промыванием эритроцитов в изотоническом фосфатном буфере, центрифугированием опытных и контрольных проб, определением оптической плотности супернатанта, значительно упрощает технологию определения цитотоксичности.

К недостаткам этого метода можно отнести тот факт, что эффект бесконтактной активации жидкостей недостаточно изучен, что обуславливает определенные трудности с интерпретацией полученных результатов.

Метод определения степени цитотоксичности и потенциальной мутагенной активности сварочных пылей основан на выявлении и идентификации в клетках ранних морфофункциональных изменений, предшествующих их выраженной дегенерации (площадь, периметр, объем ядра и ядрышек) [12].

Исследование проводится на полуавтоматическом цитоанализаторе «Интерграл-2МТ», требуется стерильное боксовое помещение с предбоксом, получение эмбриональных фибробластов (из абортного материала человека), посадка культуры эмбриональных фибробластов, введение суспензии исследуемых веществ, определение зависимости доза-эффект, приготовление препаратов клеток для микроскопических исследований (экспозиция 24, 48 и 72 ч), морфологическая оценка и кариометрический анализ препаратов культуры клеток, статистическая обработка данных.

Недостатки метода: проведение исследований исключительно в стерильных условиях (на первом этапе), необходимость получения абортного материала млекопитающих, затратность (требуется большое количество реактивов и материалов), трудоемкость (приготовление и инкубация культуры клеток, приготовление препаратов для исследования под микроскопом), информацию о морфофункциональных изменениях клеток можно получить через 5–6 дней [12].

Таким образом, исходя из вышесказанного, существует острая необходимость создания методики экспресс-оценки токсичности сварочных аэрозолей (СА), как наиболее опасного и вредного производственного фактора в сварочном производстве. СА имеют очень широкий спектр действий на организм человека, что зависит от его состава и свойств его компонентов. Химический состав сварочных элементов, электродов и их обмазки очень разнообразный, что соответственно влияет на характер и интенсивность развития патологии [13].

Необходимо отметить, что цитотоксичность частиц оказывается определяющим фактором для математического прогнозирования сравнительной опасности развития пневмокониоза, поскольку это свойство определяет кинетику накопления и задержки пыли в легких и лимфоузлах, а также — интенсивность вредного действия на ткань этих органов. Так как СА состоит из железа и его оксидов, а также соединений марганца, хрома, никеля, фтора, кремния, азота и других компонентов, отличающихся высокой токсичностью, для уменьшения вредного влияния СА важно учитывать не только элементный качественный и количественный состав аэрозоля, но и его особенности химической связи, а также тип кристаллической решетки соединений, входящих в состав СА. Однако для анализа СА на промышленных предприятиях используют в основном фотометрический метод анализа, который требует затраты большого количества времени на предварительную пробоподготовку. В ходе длительного анализа могут произойти изменения структуры аэрозоля (например, известно, что Сг (VI) в аэрозолях, образующихся при сварке нержавеющей сталей, по истечении 30–40 мин после сварки восстанавливается до Сг (III), который имеет меньшую токсичность). Поэтому для изучения структуры аэрозоля необходимо использовать методы, которые позволяют исследовать аэрозоль в процессе сварки или сразу после нее. Изучению

структуры сварочных аэрозолей в последнее время уделяют большое внимание, предлагая использовать спектроскопические, дифракционные, резонансные методы изучения сварочного аэрозоля. Известные методы по определению токсичности сварочного аэрозоля достаточно трудоемки и затратны, в свою очередь экспресс методики для оценки токсичности сварочных аэрозолей не существует. Поэтому наряду с поиском эффективных методов борьбы с пылеобразованием и методов биологической профилактики пылевых заболеваний легких, актуальное значение сохраняют задачи прогнозирования вредного действия на организм промышленных аэрозолей и разработка не только информативных, но при этом, менее трудоемких и затратных экспресс-методов скрининговой оценки токсичности СА.

В частности, экспресс-метод определения токсичности использует доступный, дешевый и стандартный биологический материал (сперматозоиды быка) и реализуется на серийно выпускаемом анализаторе АТ-05, который позволяет исследовать нестерильные вытяжки и получать результаты за время, не превышающее 3 ч. Оценку степени токсичности осуществляют на основании величины индекса токсичности It: равная отношению параме-

тров подвижности суспензии индикаторных клеток в опытном образце с параметрами подвижности индикаторных клеток в контрольном образце. При этом значение индекса токсичности от 1 до 70 % и более 120 % – опытный раствор считается цитотоксичным. Метод был успешно использован в исследовании поверхностно активных веществ (ПАВ) [14–17], оценки опасности отходов, наноматериалов и др. [18].

Учитывая характеристики и возможности данного метода, представляется целесообразным его использование для первичной гигиенической оценки сварочных материалов, а также, при разработке и изготовлении новых сварочных материалов с улучшенными гигиеническими свойствами с учетом необходимости оздоровления условий труда и профилактики профессиональных заболеваний у рабочих-сварщиков.

Данный метод может расширить возможности прогнозирования цитотоксических свойств СА, которые имеют в своем составе высокотоксичные компоненты широкого спектра действия, что обуславливает целесообразность его использования для скрининговой оценки токсичности новых сварочных материалов перед выпуском их в серийное производство.

Литература

1. Cytotoxicity and morphological transforming potential of cobalt nanoparticles, microparticles and ions in Balb/3T3 mouse fibroblasts: an in vitro model / Sabbioni E. [et al.] // *Nanotoxicology*. – 2014. – V. 8 (4). – P. 455–64.
2. ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies / Hartung T. [et al.] // *Altern Lab Anim*. – 2003. – V. 31 (5). – P. 473–81.
3. Патент Шарапова Н. Е. Кацнельсон Б. А. Способ определения цитотоксичности малорастворимых пылей (RU 2019832).
4. Петров Борис Алексеевич (RU), Петров Сергей Борисович (RU) Патент Способ определения цитотоксичности малорастворимых производственных пылей (RU 2480751).
5. Казанкин Д. С. Универсальный комплекс «ИКАР-ТЕСТ» для бесконтактной регистрации динамики физических, химических и биохимических процессов в водных растворах / Д. С. Казанкин, О. В. Широносков, В. Г. Широносков // Сб. тезисов ВНКФ-13, 20–26 апреля 2007. – Ростов-на-Дону – Таганрог, 2007. – С. 464–465.
6. Широносков В. Г. Физические основы резонансной активации воды / В. Г. Широносков // *Материалы I Международного симпозиума по электроактивации*, г. Москва, 4–5 ноября 1997 г. – Москва, 1997. – С. 220–221.
7. Широносков В. Г. Резонанс в физике, химии и биологии. Монография / В. Г. Широносков. – Ижевск: Издательский дом «Удмуртский университет», 2001. – 92 с.
8. Величковский Б. Т. Определение цитотоксичности пыли методом хемилюминесценции / Б. Т. Величковский, Л. Г. Коркина, Т. Б. Суслова // *Гиг. труда*. – 1983. – № 5. – С. 31–34.
9. Величковский Б. Т. Производственные аэрозоли в металлургии цветных металлов / Б. Т. Величковский, Б. А. Петров, Н. К. Вознесенский. – Киров, 2003. – 132 с.
10. Шарапова Н. Е. Способ сравнительной оценки цитотоксичности малорастворимых пылей по снижению активности 5'-нуклеотидазы в культуре макрофагов / Н. Е. Шарапова // *Мед. труда и пром. экология*. – 1994. – № 8. – С. 16–20.
11. Szentéi E. Die Hamolysedurch Quarzstaub und ihre Hemmung / E. Szentéi // In Buch «Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau». – Detmold, Verlag Hermann Bosmann GmbH, 1967. – Bd 6. – S. 149–156. – прототип.

12. Методические рекомендации «Определение степени цитотоксичности и потенциальной мутагенной активности сварочных пылей» / А. А. Волобоева, Л. Н. Горбань. – Киев, 1992. – 12 с.

13. Токсикологія аерозолів: монографія / [Ю. І. Кундів, М. М. Корда, М. О. Кашуба, О. В. Демецька]. – Тернопіль : ТДМУ «Укрмедкнига», 2015. – 256 с.

14. Федосеева Т. А. Гигиеническое обоснование прогнозирующей способности альтернативного метода при оценке опасности моющих и чистящих средств: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук: 14.00.07 — гигиена / Т. А. Федосеева. – Мытищи, 2007.

15. Тимофеев Г. Безопасность и эффективность на пути косметического средства к потребителю / Г. Тимо-

Лук'яненко А. О.

МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ПРОМИСЛОВОГО ПИЛУ «IN VITRO»

Інститут електрозварки імені Є. О. Патона Національної академії наук України, м. Київ

Вступ. Поряд з пошуком ефективних методів боротьби з пилоутворенням і методів біологічної профілактики пилових захворювань легень, актуальне значення зберігають завдання прогнозування шкідливого впливу на організм промислових аерозолів, а також розробка менш трудомістких і витратних експрес-методів скринінгової оцінки токсичності зварювальних аерозолів.

Мета дослідження — обґрунтувати необхідність створення методики експрес-оцінки токсичності зварювальних аерозолів.

Матеріали та методи дослідження. Аналітичний огляд наукових публікацій було проведено з використанням закордонних профільних видань, текстової бази даних PUB MED, бази даних Національної наукової медичної бібліотеки та Національної бібліотеки України імені В. І. Вернадського.

Результати. Розглянуто методи визначення токсичності промислових аерозолів. Обґрунтовано необхідність для створення експрес-оцінки токсичності зварювальних аерозолів. Новий експрес-метод визначення токсичності використовує доступний, дешевий і стандартний біологічний матеріал, який дозволяє досліджувати нестерильні витяжки та отримувати результати за час, що не перевищує 3 години.

Висновки. Новий експрес-метод оцінки токсичності може розширити можливості прогнозування цитотоксичних властивостей зварювальних аерозолів, які мають в своєму складі високотоксичні компоненти широкого спектра дії.

Ключові слова: методи *in vitro*, повітря робочої зони, цитотоксичність, промисловий пил, зварювальний аерозоль

Lukianenko A. O.

METHODS OF DETERMINATION OF THE DEGREE OF CYTOTOXICITY OF INDUSTRIAL DUSTS IN VITRO

Paton Electric Welding Institute of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Background. Along with the search for effective methods of dusting and biological methods of preventing dust lung diseases problems of forecasting the harmful effects of industrial aerosols on the body remains rather actual, as well as the development of less labor-intensive and costly express methods for screening assessment of the toxicity of welding fumes.

The aim of the study. To ground the necessity of developing a method of express assessment of the toxicity of welding fumes.

Materials and methods. There have been conducted a review of scientific publications, using world and national sources, the databases of the PubMed, National medical library and Vernadsky National Library of Ukraine.

Results. The methods of determining the toxicity of industrial aerosols have been considered. The necessity to develop an express method for assessment of the toxicity of welding fumes has been grounded. A new express method of determining the toxicity, using affordable, cheap and standard biological materials makes it possible to investigate the unsterile extracts and receive results for a period not exceeding 3 hours.

Conclusions. A new method of assessing the toxicity can broaden the possibilities to prognosticate cytotoxic properties of welding fumes, which are composed of highly toxic components of a wide spectrum.

Key words: *in vitro* methods, working zone air, cytotoxicity, industrial dust, welding fumes

References

1. Sabbioni, E., et al. 2014, «Cytotoxicity and morphological transforming potential of cobalt nanoparticles, microparticles and ions in Balb/3T3 mouse fibroblasts: an in vitro model», *Nanotoxicology*, v. 8, no. 4, pp. 455–64.
2. Hartung, T., et al. 2003, «ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies», *Altern Lab Anim*, v. 31, no. 5, pp. 473–81.
3. Patent, Authors: Sharapova N. E., Katsnelson B. A. A method of determination of cytotoxicity of insoluble dusts (RU 2019832) (in Russian).
4. Patent, Authors: Petrov B. A., Petrov S. B. (RU), A method of determination of insoluble industrial dusts (RU 2480751) (in Russian).
5. Kazankin, D. S., Shironosov, O. V., Shironosov, D. G. 2007, A universal complex «Ikar-Test» for contactless recording the dynamics of physical, chemical and biochemical processes in water solutions, Collection of papers, Taganrog, pp. 464–465 (in Russian).
6. Shironosov, V. G. 1997, Physical grounds of resonance water activation, Materials of the 1st Int. Symposium on electroactivation, Moscow, 4–5 November 1997, pp. 220–221 (in Russian).
7. Shironosov, V. G. 2001, Resonance in physics, chemistry and biology. Monograph, Izhevsk : Udmurskiy University, 92 p. (in Russian).
8. Velichkovskiy, B. T., Korkina, L. G., Suslova, T. B. 1983, «Determination of dust cytotoxicity by chemiluminescence method», *Gig. truda*, no. 5, pp. 31–34 (in Russian).
9. Velichkovskiy, B. T., Petrov, B. A., Voznesenskiy, N. K. 2003, Industrial aerosols in the metallurgy of non-ferrous metals. Kirov, 132 p. (in Russian).
10. Sharapova, N. E. 1994, «A method of comparative assessment of cytotoxicity of insoluble dusts by the decrease of the activity of 5'-nucleotidase in macrophage cultures», *Med. truda i prom. ekologiya*, no. 8, pp. 16–20 (in Russian).
11. Szentei, E. 1967, Die Hamolysedurch Quarzstaubund ihre Hemmung, In Buch «Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub – und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau», Detmold, Verlag Hermann Bosmann GmbH, S.149–156 (in German).
12. Voloboyeva, A. A., Gorban, L. N. 1992, Determination of the degree of cytotoxicity and potential mutagenic activity of welding dusts. Method. recommendations, Kiev, 12 p. (in Russian).
13. Kundiiev, Yu. I., Korda, V. V., Kashuba, O. V., Demetska, O. V. 2015, Toxicology of aerosols: Monograph. Ternopil : Ukrmedkniga, 256 p. (in Ukrainian).
14. Fedoseyeva, T. A. 2007, Hygienic substantiation of the prognosticated ability of an alternative method in assessment of the danger from detergents and cleansers: Thesis, dissert., cand. med. sci.: 14.00.07 – Hygiene, Mytisch (in Russian).
15. Timofeyev, G. 2007, «Safety and efficiency in the way from a cosmetic means to a supplier», *SORF_Journal* (Russian version), no. 5, pp. 34–40 (in Russian).
16. Karkischenko, N. N. 2010, «From a model on animals to alternative models in toxicology», *Toksikol. vetstnik*, no. 3, pp. 18–21 (in Russian).
17. Yalovenko, E. I., Rayetskaya, E. V., Golichenkov, A. V. et al. 2014, «Assessment of toxicity of surfactants on the culture of mobile cells», *Envir.&Health*, no. 2.
18. Leonenko, N. S., Leonenko, O. B., Demetska, O. V. et al. 2015, «Investigations on the cytotoxicity of nanoparticles of cadmium sulfide and lead sulfide, stabilized by organic compounds», *Suchasni problemy toksikologii*, no. 3, pp. 56–60 (in Ukrainian).

Поступила: 13 декабря 2016 г.

Контактное лицо: Лукьяненко Анна Олеговна, отдел Проблем охраны труда и экологии в сварочном производстве, Институт электросварки имени Е. О. Патона НАН Украины, д. 11, ул. Казимира Малевича (Боженко), г. Киев, 03680. Тел.: + 38 0 44 200 52 77. Электронная почта: a.lukianenko@ukr.net