

УДК 551.578.4:57.044

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ УГОЛЬНО-ПОРОДНЫХ ПЫЛЕВЫХ ТВЕРДЫХ ЧАСТИЦ ТЧ10 И ТЧ0,1, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРОБ СНЕГА, В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК A549\*

Ларионов А.В., Баранова Е.Д., Ощепкова К.И.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», Кемерово,

e-mail: alekseylarionov09@gmail.com

Твердые частицы (ТЧ) размером <10 мкм представляют собой неоднородную группу объектов, способных проникать в дыхательные пути человека. Настоящее исследование направлено на выделение образцов грубых и ультрадисперсных ТЧ на некотором расстоянии от предприятий добычи угля открытым способом (1–1,5 км от границы карьеров за пределами санитарно-защитной зоны). ТЧ были выделены и сконцентрированы из образцов снега, что позволило аккумулировать относительно большое количество ультрадисперсных частиц (50–60 мг) с пяти объектов: трех разрезов (P1, P2, P3), угольной электростанции (Т) и двух контрольных территорий (K1, K2). Токсичность оценивали в альвеолярных эпителиоцитах карциномы человека A549 после шестичасового контакта *in vitro* с образцами ТЧ. Пролиферация клеток A549, подвергшихся воздействию образцов ТЧ0,1, была значительно ниже ( $p < 0,01$ ) в пробах P2, P3 и Т, чем у клеток, экспонированных воздействию ТЧ-10 в той же концентрации. Образцы ТЧ0,1 в пробах Т, K1 и K2 показали повышенный уровень повреждений (микроядра, %) по сравнению с образцами ТЧ10. Полученные данные были сопоставлены с проведенным ранее анализом фракционного и химического состава ТЧ. Результаты исследования показывают, что ультрадисперсные частицы ТЧ0,1 заслуживают особого внимания как биологический агент, отличный от более крупных ТЧ. Их токсичность может быть вызвана физико-химическими свойствами кристаллической фазы, а не специфическими компонентами источника загрязнения.

**Ключевые слова:** ТЧ, наночастицы, ультрадисперсные частицы, загрязнение воздуха, химические свойства ТЧ, микроядра, A549

\*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-50114.

## GENOTOXIC EFFECTS OF CARBON-ROCK PM10 AND PM0.1 ISOLATED FROM SNOW SAMPLES IN A549 CELL CULTURE

Larionov A.V., Baranova E.D., Oshchepkova K.I.

Kemerovo State University, Kemerovo, e-mail: alekseylarionov09@gmail.com

Particulate matter (PM) <10  $\mu\text{m}$  in size represents a heterogeneous group of objects capable of entering the human respiratory tract. The present study is aimed at isolating samples of coarse and ultrafine PM at some distance from open-pit coal mining enterprises (1–1.5 km from the boundary of the quarries outside the sanitary protection zone). PM were isolated and concentrated from snow samples, which allowed the accumulation of relatively large amounts of ultrafine particles (50–60 mg) from five sites: three sections (P1, P2, P3), a coal-fired power plant (T) and two control areas (K1, K2). Toxicity was assessed in alveolar epithelial cells of human carcinoma A549 after 6 h of *in vitro* contact with PM samples. The proliferation of A549 cells exposed to PM0.1 samples was significantly lower ( $p < 0.01$ ) in P2, P3 and T samples than in cells exposed to PM-10 at the same concentration. Samples of PM0.1 in samples T, K1 and K2 showed an increased level of damage (microkernels, %) compared with samples of PM10. The data obtained were compared with previous analysis of the fractional and chemical composition of PM. The results of the study showed that ultrafine PM0.1 particles deserved special attention as a biological agent distinct from larger PM. Their toxicity can be caused by the physicochemical properties of the crystalline phase, rather than by the specific components of the source of contamination.

**Keywords:** PM, nanoparticles, ultrafine particles, загрязнение воздуха, химические свойства ТЧ, микроядра, A549

Добыча полезных ископаемых сопровождается выбросом большого объема аэрозолей, которые включают твердые частицы (ТЧ). В процессе добычи угля большая часть ТЧ образуется в результате механического разрушения угля и материнских пород. ТЧ могут участвовать в переносе газообразных компонентов и аэрозолей, которые способны воздействовать на дыхательные пути. Высокая влажность может сократить выбросы ТЧ; технические процессы, например бурение и взрывы, удаление верхнего слоя почвы, транспортировка угля, эрозия открытых складов полезных ископаемых

и многие другие факторы, могут увеличить выбросы ТЧ [1]. Распространение пыли от источника может меняться от сезона к сезону. В исследуемом районе снижение температуры и средней скорости ветра зимой приводит к уменьшению перемешивания воздушных масс и распространению ТЧ в нижних пограничных слоях атмосферы. Угольные хранилища и отвалы также являются важным источником ТЧ, а горные породы с низкой влажностью способны генерировать больше пыли, чем сам уголь [2]. Транспортировка угля железнодорожным и автомобильным транспортом значительно

увеличивает местную генерацию ТЧ, особенно вдыхаемых ТЧЗ и ТЧ10. Даже если расстояние перевозки невелико, дороги могут располагаться вблизи жилых домов и рабочих мест, и генерируемые ТЧ напрямую влияют на людей [3, 4].

Крупные частицы от 2,5 до 10 мкм (ТЧ10) откладываются в верхних дыхательных путях, тогда как мелкая фракция размерами 0,1–2,5 мкм (ТЧ2,5) проникает в нижние дыхательные пути и альвеолы. Фракция ТЧ2,5 считается наиболее опасной и способна вызывать химические реакции в альвеолярных областях и перенос токсичных компонентов к альвеолярной стенке. Площадь поверхности ТЧ0,1 может быть до 100 раз выше, чем у крупных частиц сопоставимой массы; кроме того, они обладают большей способностью к поглощению тяжелых металлов и других сопутствующих загрязнителей по сравнению с крупными частицами [5]. Это обеспечивает высокую способность к адсорбции органических или неорганических загрязнителей, включая активные формы кислорода. Воздействие наночастиц часто обсуждается в связи с клеточными воспалительными реакциями и индукцией окислительного стресса, а патологические реакции легочной ткани могут включать эпителиально-мезенхимальный переход. Воздействие ТЧ0,1 может влиять на характер экспрессии генов. Наночастицы, генерируемые при сгорании дизельного топлива и биомассы, могут индуцировать экспрессию воспалительных маркеров и транскрипционных маркеров.

С нашей точки зрения, важно исследовать частицы вдыхаемых ТЧ, способных переноситься на большое расстояние от источника загрязнения и экспонировать не только в профессиональных группах, но и в условиях проживания людей. Представленное исследование было направлено на выделение образцов крупнодисперсных и ультрадисперсных ТЧ на определенном расстоянии от угледобывающих предприятий (1–1,5 км от границы карьера). Мы предположили, что эти образцы будут отражать комплексное воздействие, сочетающее распространение частиц вдоль дорог перевозки угля, воздушные потоки от объекта и т.д. Используя метод снеговой съемки, мы собрали относительно большое количество ультрадисперсных частиц (50–60 мг) для моделирования экспозиции клеток человека *in vitro*.

Настоящее исследование направлено на выделение образцов грубых и ультра-

дисперсных ТЧ на некотором расстоянии от предприятий добычи угля открытым способом (1–1,5 км от границы карьеров за пределами санитарно-защитной зоны) и исследование их генотоксических свойств на модели клеток легкого.

### Материалы и методы исследования

Сбор и выделение ТЧ. Образцы частиц были собраны на территории Кемеровской области (Западная Сибирь, Россия) в конце периода снегонакопления (март 2020 г.). Все пробы собраны на отдалении 1–1,5 км от объектов угольной промышленности, за пределами санитарно-защитной зоны (табл. 1). Направление сбора проб по отношению к объекту было выбрано с учетом преобладающего направления ветра в зимний период.

Таблица 1

Точки сбора ТЧ

Пункт сбора ТЧ	Символ	Удаление от промышленных предприятий, м
Карьер «Бачатский»	P1	1250
Карьер «Новобачатский»	P2	500
Карьер «Пермяковский»	P3	1250
Угольная электростанция «Беловская»	T	1700
Р-н д. Красная	K1	>15000
Р-н п. Кузбасский	K2	>25000

Отбор проб проводился методом снеговой съемки (ГОСТ 17.1.5.05-85) на участке 5 × 5 м. Пробы собирались с помощью устройств для отбора проб снега из химически стойкого полимерного материала. В каждой точке сбора проб было отобрано десять проб снега; эти образцы сначала размораживали, а затем смешивали в равных пропорциях в лаборатории.

Замороженные образцы размораживали и подвергали последовательной фильтрации с использованием вакуумной системы Sterifil (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) на мембранных нейлоновых фильтрах с различными диаметрами пор (10, 2,5 и 0,1 мкм) (GVS, Sanford, FL, США). Суспензии фракций ТЧ10 и ТЧ2,5 получали путем удаления фракций из фильтров в сверхчистой водной среде (Simplicity, Merck KGaA, Дармштадт, Германия) с использованием ультразвуковой ванны Elmasonic S30H (Elma, Singen, Герма-

ния). Частицы 10–2,5 и 2,5–0,1 были смешаны и в дальнейшем обозначены как ТЧ10. Таким образом, для проведения эксперимента были получены образцы ТЧ10 (10–0,1 мкм) и ТЧ0,1 (<0,1 мкм). Далее суспензии ТЧ концентрировали с использованием вакуумного роторного концентратора (Эппендорф, Гамбург, Германия) и высушивали. В качестве положительного контроля использовалась суспензия наноразмерного алюминиевого порошка ALEX (Advanced Powder Technologies, Томск, Россия). Образец стерилизовали при 121°C в течение 30 мин и ресуспендировали в ультразвуковой ванне в течение 5 мин.

Альвеолярные эпителиальные клетки карциномы человека A549 использовались для экспонирования образцами ТЧ. Для экспериментов клетки были посажены, собраны и подсчитаны, как описано ранее [6]. Финальные концентрации проб ТЧ составляли 0,25, 0,5 и 1 мг/мл, все варианты эксперимента повторялись 3 раза. Для экспонирования клетки высаживали в шестилуночные культуральные планшеты (Эппендорф, Гамбург, Германия), после чего клетки культивировали в течение 24 ч, далее 6 ч с образцами ТЧ и 48 ч со свежей средой. Параллельно выполняли пробы отрицательного («К–»), положительного («К+») и контроля разбавления («Кр»).

Выживаемость клеток рассчитывали как долю (%) жизнеспособных клеток к общему количеству клеток, определенному в образце с помощью камеры Горяева. В качестве показателя пролиферации рассчитывали «Относительное увеличение числа клеток – Relative increase in cell count» (RICC) [7] согласно уравнению (1).

Для проведения микроядерного (МЯ) теста использовали  $10^5$  клеток, полученных после удаления среды. Клеточные суспензии фиксировали с помощью холодного фиксатора Кларка (метанол: уксусная кислота, 3:1). Препараты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Altami LUM 1 («Альтами», Санкт-Петербург, Россия) с увеличением  $\times 1000$ . Препараты шифровали, чтобы исключить субъективность. Было проанализировано 1000 клеток с каждого препарата.

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, США). Для каждого параметра были рассчитаны средние значения и стандартные отклонения. Различия между образцами, обработанными частицами из разных точек определяли с помощью рангового теста Крускала–Уоллиса. Сравнение параметров между образцами ТЧ10 и ТЧ0,1, а также парное сравнение параметров образцов из разных точек проводили с помощью теста Манна–Уитни.

### Результаты исследования и их обсуждение

Выживаемость и токсичность образцов ТЧ оценивали при экспонировании клеток суспензиями ТЧ с концентрацией 0,25, 0,5 и 1 мг/мл. Показатели выживаемости и пролиферации снижались с повышением содержания ТЧ во всех образцах. Значительное снижение пролиферации клеток отмечено в образцах Р2, Р3 и Т для фракции ТЧ0,1 и Р1 для фракции ТЧ10. Снижение выживаемости отмечено для пробы Р1 ТЧ10, а также Р1, Т, К1 и К2 для фракции ТЧ0,1 (табл. 2).

Частота микроядер в образцах клеток A549, экспонированных ТЧ, значительно превышала показатели отрицательного контроля и контроля разведения для всех проб с концентрацией 1 мг/мл. Значимое увеличение частоты МЯ отмечено в пробах положительного контроля (наночастицы  $Al(OH)_3$ ) по сравнению с образцами отрицательного контроля ( $p \leq 0,001$ ). Увеличение концентрации ТЧ (различие между концентрациями 0,25 до 1 мг/мл) вызывало значимое повышение частоты МЯ в образцах Р2, Р3 и К1 для ТЧ10 и Т, К1 и К2 для ТЧ0,1 соответственно (табл. 3). Сравнение эффектов ТЧ10 и ТЧ0,1 показало, что для 5 образцов из 6 точек Р2, Р3, Т, К1, К2 среднее значение МЯ для ТЧ0,1 превышало ТЧ10 ( $p < 0,05$ ). Кроме того, не было отмечено существенной разницы между отрицательным контролем и контролем разбавления. Таким образом, можно сделать вывод, что клеточная модель была точной и отражала последовательное увеличение интенсивности экспонирования.

$$RICC = \frac{\text{Увеличение количества клеток в экспонируемой культуре} \\ (\text{число клеток в конце} - \text{число клеток в начале})}{\text{Увеличение количества клеток в отрицательном контроле} \\ (\text{число клеток в конце} - \text{число клеток в начале})}, \quad (1)$$

Таблица 2

Показатели выживаемости и пролиферации (RICC) в культурах клеток А549, экспонированных ТЧ

		RICC		Выживаемость, %	
Отрицательный контроль		100		96,7±3,2	
Контроль разведения		97,5±3,8		92,2±5,6	
Положительный контроль (1 мг/мл)		20,7±18,3		60,9±6,9	
Проба	Концентрация ТЧ, мг/мл	ТЧ10		ТЧ0,1	
		RICC	Выживаемость, %	RICC	Выживаемость, %
P1	1	33,6±7,1	55,3±16,5	45,6±7,1	43,4±13,5
	0,5	56,9±9,6	85,7±9,5	61,7±7,2	65,7±15,4
	0,25	89,2±9,1	86,0±13,1	87,9±12,2	91,7±16,2
P2	1	38,3±11,1	74,4±9,4	28,7±10,6	65,1±13,1
	0,5	59,7±12,3	78,8±14,7	53,1±15,8	75,1±16,4
	0,25	73,1±13,2	84,3±17,8	61,5±18,1	91,7±11,9
P3	1	44,7±13,0	79±8,3	34,4±8,4	66,2±15,8
	0,5	47,2±16,0	86,3±11,25	50,1±9,9	73,7±12,9
	0,25	86,3±9,5	86±13,8	68,3±16,5	91,3±12,4
T	1	22,4±12,0	64,8±13,9	18,5±5,9	49,4±17,3
	0,5	48,6±14,4	69,6±12,8	48,6±15,6	68,1±15,6
	0,25	56,1±12,6	86,5±14,6	89,7±13,8	81,8±14,7
K1	1	12,1±12,4	68,2±13,6	41,2±4,4	35,4±19,5
	0,5	22,9±16,4	74,4±16,9	54,9±9,5	51,8±15,2
	0,25	44,9±12,3	84,1±14	60,7±10,9	83,3±13
K2	1	27,7±12	79,2±13,6	45,3±7,3	35,5±19,5
	0,5	57,1±16,5	88,4±16,9	52,5±11,5	63,8±15,4
	0,25	82,4±22,3	90,7±14,9	75,9±12,9	77,5±13,2

Примечание: для выделенных значений отмечены значимые различия между образцами с меньшей и большей концентрациями ТЧ (0,25–1 мг/мл),  $p < 0,01$ .

Выполненный ранее анализ химического состава данных микро- и наночастиц методами абсорбционной спектроскопии позволил установить их преимущественно минеральное происхождение [6]. ТЧ содержат минеральное вещество, кристаллические частицы, элементарный углерод и органическое вещество. Значительную составляющую всех исследованных образцов составляла аморфная фаза. Образцы ТЧ10 содержали кварц. Также для образцов ТЧ10 в пробах P1, P2 и T и для всех частиц ТЧ0,1 было обнаружено значительное содержание кальцита. Присутствие аморфного углерода отмечалось в образцах ТЧ10 во всех пробах, но не в образцах ТЧ0,1, вероятно, размеры частиц углерода превышали 100 нм. Кристаллические частицы, присутствующие в образцах P1-3 и T, были представлены кальцитовыми поликри-

сталлическими кварцевыми и аморфными силикатными фазами, которые имеют развитую поверхность. Указанные особенности ТЧ могут служить источником обнаруженных генотоксических свойств, если предположить, что токсичность пропорциональна суммарной площади кристаллической поверхности и/или веществам, адсорбированным на поверхности частиц.

ТЧ0,1 считаются высокотоксичными веществами с более высокими концентрациями летучих и абсорбированных соединений, с обогащением до 50 раз в сравнении с грубыми (ТЧ10) или мелкодисперсными фракциями (ТЧ2,5). В литературе упоминается также возможность увеличения числа окисгенированных функциональных групп на поверхности, что коррелировало с высоким содержанием углерода в ТЧ0,1.

Таблица 3

Показатели микроядерного теста в клетках А549, экспонированных ТЧ

		Всего МЯ, ‰	
Отрицательный контроль		6,5±2,3	
Контроль разведения		7,5±3,6	
Положительный контроль (1 мг/мл)		26,3±3,8	
Проба	Концентрация ТЧ, мг/мл	ТЧ10	ТЧ0,1
P1	1	30±7,1	33,7±7,1
	0,5	26±4,6	31±7,2
	0,25	22±3,7	19±5,2
P2	1	<b>27,3±3,8</b>	33±6,5
	0,5	24,5±4,6	30,5±4,6
	0,25	13,1±3,2	24,2±2,7
P3	1	<b>23,5±3,3</b>	34,5±8,4
	0,5	20±3,8	33,3±3,8
	0,25	11,8±3,3	26,7±3,8
Т	1	19,7±3,7	<b>35,9±4,7</b>
	0,5	22±4,6	32,3±3,3
	0,25	18,3±3,4	19,7±3,8
K1	1	34±6,5	41,2±7,4
	0,5	25±5,4	38±6,5
	0,25	11±3,3	17±4,6
K2	1	22,5±12,0	<b>38±7,3</b>
	0,5	23,0±6,5	33,5±10,5
	0,25	16,3±4,6	21,7±3,7

Примечание: для выделенных значений, отмечены значимые различия между образцами с меньшей и большей концентрациями ТЧ (0,25–1 мг/мл),  $p < 0,01$ .

Кроме того, при карьерном способе добычи уголь хранится на солнечном свете при высоких температурах окружающей среды, где самопроизвольное и неполное сжигание угля может привести к выбросам ПАУ [8]. В частности, на открытых горных объектах эти токсичные вещества выбрасываются в атмосферу, где они могут образовывать сложные смеси (минеральная фракция / черный уголь / выхлопные газы транспортных средств / взрывчатые компоненты) [9]. Компоненты таких смесей могут оказывать потенциально синергетическое воздействие, и, следовательно, такие смеси представляют собой существенную угрозу для здоровья и безопасности населения, подвергнувшегося воздействию.

#### Заключение

В данной работе нам удалось выделить ТЧ размером менее 10 мкм, а также отдельно выделить фракцию наночастиц ТЧ0,1 и оценить их генотоксические свой-

ства, располагая информацией о физико-химическом составе ТЧ. Изолированные частицы были преимущественно кристаллическими со значительным содержанием органического углерода в микрофракции ТЧ10. Оценка биологических эффектов показала увеличение частоты микроядер и снижение пролиферативных параметров в образцах, подвергшихся воздействию ТЧ0,1, по сравнению с образцами, подвергшимися воздействию ТЧ10. Возрастание частоты микроядер было обнаружено в образцах Т (тепловая электростанция) и К1, К2 (территории без промышленной нагрузки). Полученные результаты можно интерпретировать как отражение токсических свойств нанобъектов, сопровождающих частицы разного происхождения. Мы предполагаем, что ТЧ0,1 отличаются от более крупных ТЧ повышенной токсичностью, источником которой служит преимущественно минеральная фаза.

**Список литературы**

1. Richardson C., Rutherford S., Agranovski I. E. Open Cut Black Coal Mining: Empirical Verification of PM<sub>2.5</sub> Air Emission Estimation Techniques. *Atmospheric Res.* 2019. № 216. P. 151–159. DOI: 10.1016/j.atmosres.2018.10.008.
2. Cao Y., Liu T., He J. Fugitive Emission Rates Assessment of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> from Open Storage Piles in China. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2018. № 128. P. 012136. DOI: 10.1088/1755-1315/128/1/012136.
3. Akaoka K., McKendry I., Saxton J., Cottle P.W. Impact of Coal-Carrying Trains on Particulate Matter Concentrations in South Delta, British Columbia, Canada. *Environ. Pollut.* 2017. № 223. P. 376–383. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.01.034.
4. Aneja V.P., Pillai P.R., Isherwood A., Morgan P., Aneja S.P. Particulate Matter Pollution in the Coal-Producing Regions of the Appalachian Mountains: Integrated Ground-Based Measurements and Satellite Analysis. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 2017. № 67 (4). P. 421–430. DOI: 10.1080/10962247.2016.1245686.
5. Kwon H.-S., Ryu M.H., Carlsten C. Ultrafine Particles: Unique Physicochemical Properties Relevant to Health and Disease. *Exp. Mol. Med.* 2020. № 52 (3). P. 318–328. DOI: 10.1038/s12276-020-0405-1.
6. Larionov A., Volobaev V., Zverev A., Vdovina E., Bach S., Schetnikova E., Leshukov T., Legoshchin K., Eremeeva G. Chemical Composition and Toxicity of PM<sub>10</sub> and PM<sub>0.1</sub> Samples near Open-Pit Mines and Coal Power Stations. *Life.* 2022. № 12 (7). P. 1047. DOI: 10.3390/life12071047.
7. OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micro-nucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. 2016. DOI: 10.1787/9789264264861-en.
8. Liu Y., Wang R., Zhang Y., Zhao T., Wang J., Wu H., Hu P. Temporal and Spatial Distributions of Particulate Matters around Mining Areas under Two Coal Mining Methods in Arid Desert Region of Northwest China. *Environ. Technol. Innov.* 2020. № 19. P. 101029. DOI: 10.1016/j.eti.2020.101029.
9. León-Mejía G., Quintana M., Debastiani R., Dias J., Espitia-Pérez L., Hartmann A., Henriques J.A.P., Da Silva J. Genetic Damage in Coal Miners Evaluated by Buccal Micro-nucleus Cytome Assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. № 107. P. 133–139. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.023.